

9/914870

10/30101

**PCT** ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
 Oficina Internacional  
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 :  
**C12N 15/80, 15/53, 15/56, 9/06, 9/24**

A1

(11) Número de publicación internacional: **WO 98/39459**

(43) Fecha de publicación  
 internacional:

11 de Septiembre de 1998 (11.09.98)

(21) Solicitud internacional:

PCT/ES98/00056

(22) Fecha de la presentación internacional:

5 de Marzo de 1998 (05.03.98)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9700482

5 de Marzo de 1997 (05.03.97) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
 ANTIBIOTICOS, S.A.U. [ES/ES]; Avenida de Burgos, 8-A,  
 E-28036 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): **BARREDO FUENTE, José**  
 Luis [ES/ES]; Calle Moisés de León, 15-2ºB, E-24006  
 León (ES). **RODRIGUEZ SAIZ, Marta** [ES/ES]; Calle  
 Tui, 6, 1ºC, E-36209 Vigo (ES). **MORENO VALLE,**  
 Miguel Angel [ES/ES]; Calle Juan de la Cosa, 3-6ºA,  
 E-24009 León (ES). **COLLADOS DE LA VIEJA, Alfonso**  
 J. [ES/ES]; Calle Valcarce, 3-3ºC, E-24010 León (ES).  
**SALTO MALDONADO, Francisco** [ES/ES]; Calle del  
 Abrego, 33-2ºC, Prado de Somosaguas, E-28023 Madrid  
 (ES). **DIEZ GARCIA, Bruno** [ES/ES]; Calle Generalísimo  
 Franco, 7, Trobajo del Cerecedo, E-24192 León (ES).

(74) Mandatario: **DE ELZABURU MARQUEZ, Alberto**; Calle  
 Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
 BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,  
 GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
 KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,  
 MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
 SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,  
 Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),  
 Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
 TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR,  
 GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF,  
 BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: **PROMOTERS OF THE GENES GLUTAMATE DESHYDROGENASE,  $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE AND  $\gamma$ -ACTINE, AND THEIR USE IN SYSTEMS OF EXPRESSION, SECRETION AND ANTI-SENS IN FILAMENTARY FUNGI**

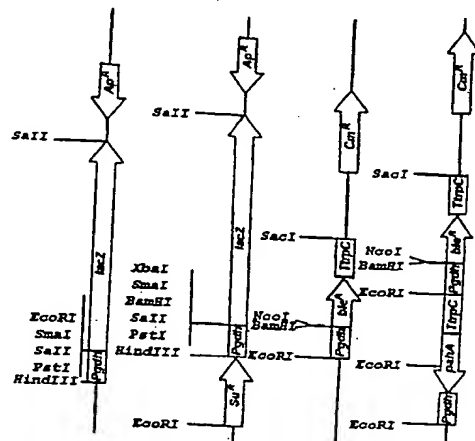
(54) Título: **PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA,  $\beta$ -N-ACETILHEXOSAMINIDASA  $\gamma$ -ACTINA Y SU UTILIZACION EN SISTEMAS DE EXPRESION, SECRECION Y ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS**

(57) Abstract

The invention relates to promoters of the genes glutamate deshydrogenase,  $\beta$ -acetylhexosaminidase and  $\gamma$ -actine and their use in systems of expression, secretion and anti-sens of filamentary fungi. The invention also relates to the use of the promoters of the genes which code: (I) glutamate deshydrogenase NADP depending (EC.1.4.1.4) of *Penicillium chrysogenum*, (II)  $\gamma$ -N-actylhexosaminidase (EC.3.2.1.52) of *Penicillium chrysogenum* and (III)  $\gamma$ -actine of *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*, which can be used for the construction of potent vectors of expression and secretion useful both for *P. chrysogenum* and for *A. chrysogenum* and related species. Said promoters can also be used for blocking the genic expression through anti-sens construction. Under the control of the above mentioned promoters, it is possible to conduct the expression of other genes in filamentary fungi, thereby increasing the production of antibiotics and/or proteins inherent to the same.

(57) Resumen

Promotores de los genes glutamato deshidrogenasa,  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa y  $\gamma$ -actina y su utilización en sistemas de expresión, secreción y antisentido de hongos filamentosos. Se describe la utilización de los promotores de los genes que codifican: (I) glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4) de *Penicillium chrysogenum*, (II)  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52) de *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum*, los cuales pueden ser utilizados para la construcción de potentes vectores de expresión y secreción útiles tanto para *P. chrysogenum* como para *A. chrysogenum* y especies relacionadas. Asimismo, estos promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión génica mediante construcciones antisentido. Bajo el control de los promotores anteriormente citados se puede dirigir la expresión de otros genes en hongos filamentosos, incrementándose la producción de antibióticos y/o proteínas inherentes a los mismos.



# UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benín	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelanda		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA,  $\beta$ -N-ACE-  
TILHEXOSAMINIDASA Y  $\gamma$ -ACTINA Y SU UTILIZACION EN SISTEMAS DE  
EXPRESION, SECRECION Y ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

Campo de la invención

5 La invención se adscribe al campo técnico de la expre-  
sión de los genes *gdh* y *hex* de *Penicillium chrysogenum* y del  
gen *act* también de *P. chrysogenum* y de *Acremonium chryso-*  
10 *genum*. Del análisis de la secuencia nucleotídica de dichos  
genes, se deduce la existencia de una región promotora que  
incluye el lugar de inicio de la traducción, la cual puede  
ser utilizada para la construcción de potentes vectores de  
expresión y secreción útiles tanto para *P. chrysogenum* como  
para *A. chrysogenum* y especies relacionadas. Asimismo, estos  
15 promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión  
génica mediante construcciones antisentido. Bajo el control  
de los promotores anteriormente citados se puede dirigir la  
expresión de otros genes en hongos filamentosos, incremen-  
tándose la producción de antibióticos y/o proteínas, inhe-  
rente a los mismos.

20 Estado de la técnica

*P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* son hongos filamentosos  
industrialmente interesantes debido a su capacidad para pro-  
ducir penicilina y cefalosporina respectivamente. El desa-  
rrollo de técnicas de manipulación genética aplicables en  
25 ambos microorganismos ha sido potenciado durante la última  
década. Entre las técnicas de manipulación genética de *P.*  
*chrysogenum* y *A. chrysogenum* se encuentran la transformación  
de protoplastos con vectores que utilizan como marcador de

- 2 -

selección el gen de resistencia a fleomicina (a partir de ahora denominado gen *ble<sup>r</sup>*) (Kolar, M. et al. (1988). Gene 62, 127-134), así como la expresión de copias adicionales intactas de genes de interés y la sustitución del promotor del gen en cuestión por otro promotor capaz de mejorar su expresión. La expresión en hongos como *P. chrysogenum* o *A. chrysogenum* de genes homólogos puede estar regulada negativamente, mientras que en el caso de genes heterólogos, su promotor puede no ser reconocido eficientemente por dichos hongos. Con la finalidad de evitar estos problemas, se ha procedido a la identificación y clonación de genes que se expresen constitutivamente y en los que preferiblemente dicha expresión no presente regulación catabólica negativa, son los denominados a partir de ahora promotores fuertes. En general, se considera que los genes de alta expresión poseen señales en la región promotora que facilitan unos elevados niveles de transcripción y que fundamentalmente participan en funciones implicadas en el metabolismo primario celular. Entre estos genes se pueden citar: los genes que codifican para glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4) (a partir de ahora denominado gen *gdh*),  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52) (a partir de ahora denominado gen *hex*) y  $\gamma$ -actina (a partir de ahora denominado gen *act*).

Existen citas previas de los genes *gdh*, *hex* y *act* procedentes de microorganismos diferentes a los que se utilizan en la presente invención. Entre la bibliografía más relevante cabe citar: (I) la secuencia nucleotídica del gen *gdh* del hongo *Neurospora crassa* (Kinnaird, J.H. and Fincham, J.R.S. (1983). Gene 26, 253-260) así como la regulación de la expresión del gen *gdhA* de *Aspergillus nidulans* (Hawkins, A.R. et al. (1989). Mol. Gen. Genet. 418, 105-111), (II) la clo-

- 3 -

nación y expresión del gen *hex1* de *Candida albicans* (Cannon, R.D. et al. (1994). J. Bacteriol. 2640-2647) y (III) la caracterización del gen *act* de *A. nidulans* (Fidel, S. et al. (1988). Gene 70, 283-293). La expresión de genes heterólogos en *P. chrysogenum* utilizando los promotores de los genes *pcbC* o *penDE* fue descrita por Cantwell, C.A. et al. en 1992 (Proc. R. Soc. London Ser. B 248, 283-289). Asimismo, también ha sido descrita la expresión de genes heterólogos en *A. chrysogenum* utilizando los promotores del gen  $\beta$ -isopropil malato deshidrogenasa (Japanese Patent Laid Open Publication No. 80295/1989) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (European Patent Application 0376226A1/1989).

La inactivación de la expresión génica en cepas industriales es en ocasiones necesaria para la eliminación de actividades enzimáticas indeseables. Debido a que el nivel de ploidía de muchas cepas industriales dificulta en la mayor parte de los casos el bloqueo de la expresión mediante disrupción génica directa, es necesaria la utilización de sistemas de inactivación de expresión independientes del nivel de ploidía. El desarrollo de construcciones antisentido expresadas bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica. Este tipo de construcciones es especialmente útil en cepas industriales debido a que sus niveles de ploidía (Künkel et al. (1992) Appl. Microbiol. Biotech. 36, 499-502) dificultan la obtención de inactivaciones génicas completas. La utilización de construcciones antisentido para el bloqueo de actividades enzimáticas ha sido descrita en levaduras (Atkins, D. et al. (1994). Biol. Chem. H-S 375, 721-729) y plantas (Hamada, T. (1996). Transgenic Research 5, 115-121; John, M.E. (1996) Plant Mol. Biol. 30, 297-306). El promotor *hex* posee la

- 4 -

particularidad de codificar para una enzima extracelular, lo cual permite su utilización para la expresión de proteínas extracelulares.

5 Sin embargo, en el estado de la técnica no existen citas que describan ni las secuencias de los genes de los hongos filamentosos utilizados en la presente invención, ni de las enzimas sintetizadas por la expresión de los mismos. Tampoco se describe en dicho Estado de la Técnica la utilización de los promotores fuertes de los genes de los hongos descritos  
10 en la presente invención, para la expresión, secreción o inactivación de la expresión génica.

#### Descripción detallada de la invención

15 La utilización de promotores fuertes para superexpresar ciertos genes puede conducir a la mejora de la producción de penicilina o cefalosporina, así como a la síntesis de nuevos antibióticos derivados de estos últimos.

Esta invención describe un nuevo procedimiento para la  
20 obtención de cepas de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* con capacidad de expresión de genes homólogos o heterólogos bajo el control de promotores fuertes. Se describe la caracterización y posterior utilización de los promotores correspondientes a los genes que codifican para glutamato  
25 deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4)-gen *gdh*- de *P. chrysogenum*,  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52)-gen *hex*- de *P. chrysogenum* y  $\gamma$ -actina -gen *act*- de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*. La utilización de los citados promotores para superexpresar genes relacionados con la biosíntesis de peni-  
30 cilina y/o cefalosporina en las cepas anteriormente mencionadas es una de las finalidades de la presente invención.

- 5 -

Asimismo, estos promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión génica mediante construcciones antisentido.

La presente invención parte de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* como donadores de los ácidos nucleicos. Una vez purificado el DNA genómico se construyeron sendas genotecas de ambos microorganismos tal y como se describe en los ejemplos 1 y 4, las cuales fueron rastreadas con: (I) oligonucleótidos sintéticos correspondientes al gen *gdh* de *N. crassa* para clonar el gen homólogo de *P. chrysogenum*, (II) combinaciones de oligonucleótidos sintetizados en base a la secuencia amino terminal de la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa para clonar el gen *hex* de *P. chrysogenum* y (III) un fragmento del gen *act* de *A. nidulans* para clonar los genes homólogos de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*. Los clones purificados en virtud de su capacidad para generar hibridación positiva con la sonda correspondiente fueron posteriormente analizados, determinándose la presencia de los genes buscados.

El gen *gdh* de *P. chrysogenum* se identificó en un fragmento *EcoRI* de 7,2 kb y en dos fragmentos *BamHI* de 2,9 y 1,5 kb respectivamente. El mapa de restricción de la región de DNA que lo incluye aparece en la figura 1. Posteriormente se determinó la secuencia de 2.816 nucleótidos (SEQ ID NO:1), la cual incluye un marco abierto de lectura (ORF) con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado cuyo codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 922 y su codón de terminación de la traducción TAA en la 2.522. Asimismo se determinó la presencia de 2 intrones de 159 pb y 56 pb entre las posiciones 971-1130 y 1262-1318 respectivamente. Dicho ORF codifica para una proteína de 49.837 Da y un punto isoeléctrico de 6.18 cuya secuencia de

461 aminoácidos (SEQ ID NO:5) posee un 72,4 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima glutamato deshidrogenasa NADP dependiente de *N. crassa*. En la región promotora se encuentran zonas ricas en pirimidinas similares a las que aparecen en genes altamente expresados, así como dos presuntas cajas TATA (esta caja se encuentra en ciertos promotores de hongos de 30 a 50 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción) (Davis, M.A. and Hynes, M.J. (1991). *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, San Diego, California) y una caja CCAAT (la cual se encuentra en alrededor del 30% de promotores de genes eucariotas de 50 a 200 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción) (Bucher, P. (1990) *J. Mol. Biol.* 212: 563-578). Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* el gen que codifica para  $\beta$ -galactosidasa (a partir de ahora denominado gen *lacZ*) de *E. coli* y el gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus*. Para ello se construyeron los plásmidos pSKGSu y pALfleo7 (figura 5) tal y como se describe en el ejemplo 1. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor *gdh* (a partir de ahora denominado *Pgdh*) es capaz de controlar la expresión tanto en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* como en *E. coli* de los genes heterólogos *lacZ* y *ble<sup>R</sup>*.

El desarrollo de construcciones antisentido expresadas bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica. Con esta finalidad se construyó el plásmido pALP888 (figura 5) tal y como se describe en el apartado 1.3 del ejemplo 1. Los resultados obtenidos confirman la posibilidad de bloquear, total o parcialmente, en *P. chrysogenum* actividades enzimáticas indeseables me-



- 7 -

diante la utilización de construcciones antisentido utilizando el *Pgdh*.

El gen *hex* de *P. chrysogenum* se identificó en un fragmento *SacI* de 3,2 kb y en otro *SalI* de 2,1 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *hex* aparece en la figura 2. Seguidamente se determinó la secuencia de 5.240 nucleótidos (SEQ ID NO:2), confirmando la existencia de dos ORFs con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado, una de las cuales se correspondía con el gen *hex*. El codón ATG de inicio de traducción del gen *hex* se encontró en la posición 1.324 y el codón de terminación TGA en la 3.112. Dicho ORF carece de intrones y codifica para una proteína de 66.545 Da y un punto isoeléctrico de 5,34 cuya secuencia de 596 aminoácidos (SEQ ID NO:6) posee un 49,0 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa de *Candida albicans*. Asimismo, la secuencia de aminoácidos deducida incluye los polipéptidos determinados químicamente a partir de la enzima purificada en las posiciones 19-40 y 99-120. En la región promotora se encuentran dos zonas ricas en pirimidinas, una presunta caja TATA y la caja CAAT. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en *P. chrysogenum* el gen *ble<sup>r</sup>* de *S. hindustanus*. Para ello se construyó el plásmido pALP480 (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 2. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor *hex* (a partir de ahora denominado *Phex*) es capaz de controlar la expresión del gen heterólogo *ble<sup>r</sup>* en *P. chrysogenum*. Asimismo, el hecho de que la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa sea una proteína abundantemente secretada por *P. chrysogenum* al medio de cultivo, posibilita la utilización del gen *hex* para la expresión y secreción de proteínas homólogas o heterólogas

en *P. chrysogenum* u hongos filamentosos relacionados. Los genes a expresar pueden ser fusionados en marco de lectura con la región promotora, incluyendo la secuencia señal de secreción del gen *hex* o bien ser fusionados en marco de lectura con el gen *hex* completo.

El gen *act* de *P. chrysogenum* (a partir de ahora denominado *actPc*) se identificó en fragmentos *Bam*HI de 5,2 kb, *Eco*RI de 4,9 kb y *Hind*III de 5,9 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *actPc* aparece en la figura 3. Una vez determinada la secuencia de 2.994 nucleótidos (SEQ ID NO:3), se confirmó la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 494 y el codón de terminación TAA en la 2.250. Dicho ORF posee 5 intrones y codifica para una proteína de 41.760 Da y un punto isoeléctrico de 5,51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:7) posee un 98,1 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína  $\gamma$ -actina de *A. nidulans*. En la región promotora se encuentran dos zonas ricas en pirimidinas, una presunta caja TATA y cuatro cajas CAAT. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en *P. chrysogenum* el gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus*. Para ello se construyó el plásmido pALPfleol (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 3. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor *act* de *P. chrysogenum* (a partir de ahora denominado *PactPc*) es capaz de controlar la expresión en *P. chrysogenum* del gen heterólogo *ble<sup>R</sup>*.

El gen *act* de *A. chrysogenum* (a partir de ahora denominado *actAc*) se identificó en fragmentos *Sal*I de 2,4 y 1,1 kb, *Sma*I de 3,9 kb y *Hind*III de 8,7 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *actAc* apa-

- 9 -

rece en la figura 4. La secuencia de 3.240 nucleótidos determinada (SEQ ID NO:4) confirmó la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 787 y el codón de terminación TAA en la 2.478. Dicho ORF posee 5 intrones y codifica para una proteína de 41.612 Da y un punto isoeléctrico de 5,51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:8) posee un 98,4 % y un 98,1 % de identidad con las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas  $\gamma$ -actina de *A. nidulans* y *P. chrysogenum* respectivamente. En la región promotora se encuentran zonas ricas en pirimidinas y una caja CAAT, no apreciándose la existencia de caja TATA. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en *A. chrysogenum* el gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus*. Para ello se construyó el plásmido pALCfleol (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 4. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor act de *A. chrysogenum* (a partir de ahora denominado PactAc) es capaz de controlar la expresión en *A. chrysogenum* del gen heterólogo *ble<sup>R</sup>*.

En todos los casos, la expresión en *P. chrysogenum* o *A. chrysogenum* del gen heterólogo bajo el control del promotor fúngico se realizó fusionando dicho gen en el marco de lectura correcto. A pesar de que a modo de ejemplo se han expresado los genes *lacZ* y *ble<sup>R</sup>*, del mismo modo podrían expresarse genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de penicilina: *pcbAB* ( $\alpha$ -aminoadipil-cistenil-valina sintetasa), *pcbC* (isopenicilina N sintetasa), *penDE* (acil-CoA:6-APA aciltransferasa), *pcl* (fenilacetil-CoA ligasa), etc. o cefalosporina: *pcbAB* ( $\alpha$ -aminoadipil-cistenil-valina sintetasa), *pcbC* (isopenicilina N sintetasa), *cefD*

- 10 -

(isopenicilina N isomerasa), *cefEF* (desacetoxicefalosporina C sintasa/hidroxilasa), *cefG* (desacetilcefalosporina C acetiltransferasa), etc. El gen a expresar puede haber sido obtenido por diferentes métodos: aislado a partir de DNA cromosómico, cDNA sintetizado a partir de mRNA, sintetizado químicamente, etc. Los procedimientos fundamentales para la correcta fusión promotor-gen están descritos en Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA y Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA.

Como cepas hospedadoras se han utilizado *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*, no obstante, cualquier cepa relacionada o mutante derivado de ellas puede ser usada. El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de *P. chrysogenum* se basó en el descrito por Cantoral et al. en 1987 (Biotechnology 5: 494-497) y Díez et al. en 1987 (Curr. Genet. 12: 277-282) y se describe en el ejemplo 1. La obtención de protoplastos y transformación de *A. chrysogenum* se describe en el ejemplo 4. En ambos casos se utilizaron el antibiótico fleomicina como marcador de selección y los plásmidos pALfleo7, pALP480, pALPfleol o pALCfleol, los cuales son portadores del gen *ble<sup>r</sup>* expresado bajo el control del *Pgdh*, *Phex*, *PactPc* y *PactAc* respectivamente. Sin embargo, podría utilizarse cualquier marcador que pueda separar selectivamente las cepas transformantes de aquellas otras que no lo son.

El transformante puede ser crecido en medios de cultivo que incluyan fuentes de carbono y nitrógeno capaces de ser asimiladas. Como ejemplos de fuentes de carbono pueden citarse glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, glicerina, ácidos

- 11 -

orgánicos, alcoholes, ácidos grasos, etc., utilizadas solas o en combinación. Ejemplos de fuentes de nitrógeno serían peptona, extracto de malta, extracto de levadura, líquido de maceración de maíz, gluten, urea, sales de amonio, nitratos, NZ-amina, sulfato amónico, etc., utilizadas solas o en combinación. Como sales inorgánicas utilizables como componentes del medio de cultivo pueden citarse fosfatos (por ejemplo fosfato potásico), sulfatos (por ejemplo sulfato sódico), cloruros (por ejemplo cloruro magnésico), etc. y como iones hierro, magnesio, calcio, manganeso, cobalto, etc. Las condiciones de cultivo como temperatura de incubación, pH del medio de cultivo, aireación, tiempo de incubación, etc. deben ser seleccionadas y ajustadas de acuerdo con la cepa utilizada. No obstante, en términos generales, la fermentación se realiza durante un periodo de 4 a 14 días en condiciones aeróbicas a una temperatura entre 20°C y 30°C y un pH entre 5 y 9.

En resumen, la presente invención incluye : (I) fragmentos de DNA que contienen los promotores de los genes *gdh*, *hex* y *act* de *P. chrysogenum* y del gen *act* de *A. chrysogenum*, (II) plásmidos que incorporan los anteriormente citados promotores junto con su lugar de inicio de traducción, (III) plásmidos en los que un gen estructural homólogo o heterólogo o un fragmento de DNA antisentido es situado bajo el control de dichos promotores, (IV) cepas de *P. chrysogenum* o *A. chrysogenum* transformadas con dichos plásmidos, (VI) cepas transformantes capaces de expresar el gen estructural o el DNA antisentido situado en el plásmido bajo el control del promotor y (VII) cepas transformantes capaces de secretar proteínas extracelulares, homólogas o heterólogas, bajo el control del *Phex*.

- 12 -

Los siguientes ejemplos describen en detalle la presente invención sin limitar su alcance.

#### EJEMPLO 1

##### 1.1. Clonación y caracterización del gen *gdh* de *P. chrysogenum*.

Con la finalidad de clonar el gen *gdh* de *P. chrysogenum*, se construyó una genoteca en el vector fágico  $\lambda$ GEM12 siguiendo procedimientos establecidos (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Para ello, el DNA total del hongo (purificado según el método descrito por Barredo et al. (1994) Patente española P9400931) fue parcialmente digerido con *Sau3AI* y los fragmentos de alrededor de 20 kb se purificaron en un gradiente de sacarosa (10-40%). Estos fragmentos se ligaron con los brazos del vector previamente digeridos con *BamHI* y purificados y seguidamente la mezcla de ligación se encapsidó *in vitro* utilizando el sistema Gigapack II Gold (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con la reacción de encapsidación resuspendida en 500  $\mu$ l de SM se realizaron infecciones de *E. coli* LE392 para titular el número de fagos presentes y de *E. coli* NM539 con la finalidad de determinar el porcentaje de fagos recombinantes. *E. coli* NM539 es una cepa lisógena del fago P2 y sólo origina placas de lisis cuando el fago que la infecta carece de la región central dispensable. El título fágico resultó ser de 132 ufp/ $\mu$ l (66.000 ufp totales) en *E. coli* LE392 y de 113 ufp/ $\mu$ l (56.500 ufp totales) en *E. coli* NM539. Esto significaba que

- 13 -

alrededor del 85 % de los fagos eran portadores de un inserto de DNA exógeno. El cálculo del número de fagos recombinantes necesarios para constituir una genoteca completa se realizó con la ecuación:  $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$ ; donde "p" es la probabilidad deseada, "f" la proporción del genoma del organismo elegido contenida en un recombinante y "N" el número necesario de recombinantes. Asumiendo que el genoma de *P. chrysogenum* está contenido en alrededor de 30.000 kb (Fierro et al. (1993). Mol. Gen. Genet. 241: 573-578) y que el promedio de los insertos encapsidados fuera de 18 kb (a pesar de que se habían seleccionado tamaños alrededor de 20 kb), con el número de fagos recombinantes obtenidos se había obtenido una genoteca de *P. chrysogenum* con una probabilidad del 99.999 %. Una vez realizadas esta serie de comprobaciones teóricas, se infectó *E. coli* NM539 y la genoteca completa se extendió sobre 5 placas Petri de 150 mm de diámetro (alrededor de 11.300 ufp/placa Petri), se recogió en 50 ml de SM más 2.5 ml de cloroformo y se guardó a 4°C. De esta forma se disponía de un volumen suficientemente amplio y representativo de fagos recombinantes (5.300 ufp/ $\mu$ l) listos para ser plaqueados en cualquier momento.

Alrededor de 60.000 ufps fueron extendidas sobre 3 placas Petri de 150 mm de diámetro y seguidamente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (BA85, 0,45  $\mu$ m, Schleicher & Schuell). Dichos filtros se hibridaron utilizando protocolos estándar (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) con oligonucleótidos sintéticos correspondientes al gen *gdh* de *N. crassa*. Un total de 10 clones positivos fueron purificados a través de un segundo y tercer ciclo de hibridación y seguidamente su DNA fue

- 14 -

digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen *gdh* en un fragmento *EcoRI* de 7,2 kb y en dos fragmentos *BamHI* de 2,9 y 1,5 kb respectivamente. Una vez  
5 realizadas las correspondientes subclonaciones en los plásmidos pBluescript I KS(+) (Stratagene) y pUC13, se construyeron los plásmidos pALP784 y pALP785, los cuales se corresponden con ambas orientaciones de un fragmento de 2,9 kb *Sau3AI-XbaI* que incluye el gen *gdh*. El mapa de restricción  
10 de la región de DNA que incluye dicho gen aparece en la figura 1.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen *gdh*, se construyeron una serie de clones a partir de los plásmidos pALP784 y pALP785 por el método  
15 "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se secuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 2.816 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:1) se  
20 analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 922 y el codón de terminación TAA en la 2.522. Asimismo se determinó la presencia  
25 de 2 intrones de 159 pb y 56 pb entre las posiciones 971-1130 y 1262-1318 respectivamente. Dicho ORF codifica para una proteína de 49.837 Da y un punto isoeléctrico de 6.18 cuya secuencia de 461 aminoácidos (SEQ ID NO:5) posee un  
30 72,4 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima glutamato deshidrogenasa NADP dependiente de *N. crassa*.



- 15 -

En la región promotora se encuentran varias zonas ricas en pirimidinas, si bien la localizada entre las posiciones 766-796 es la más extensa. Estas zonas aparecen en genes altamente expresados y se localizan inmediatamente por encima del lugar de inicio de la transcripción. Adicionalmente existen dos presuntas cajas TATA (cuya secuencia consenso en hongos es TATAAA) en las posiciones 752 (TATATAATT) y 852 (TATAATTT). Estas cajas TATA se encuentran en hongos de 30 a 50 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción, por lo que lo más probable es que la auténtica caja TATA sea la situada en la posición 752, es decir 42 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT se encuentra en la región promotora de alrededor del 30% de los genes eucariotas conocidos situada entre 50 y 200 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción. En la región promotora del gen *gdh* existe la caja CCAAT en la posición 691, es decir en torno a 105 pb por encima del presumible lugar de inicio de la transcripción.

#### 1.2. Expresión de genes testigo en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* bajo el promotor *gdh*.

El proceso de transformación y selección de transformantes de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* se realizó, tal y como se describe a continuación, en función de su resistencia al antibiótico fleomicina. Para ello fue preciso construir el plásmido pALfleo7, el cual posee un tamaño de 5.4 kb y es portador del gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus* expresado bajo el control del *Pgdh* como marcador en hongos, del gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en *E. coli* y del polilinker del plásmido pBC KS (+) (Stratagene).

- 16 -

El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de *P. chrysogenum* fue el descrito por Cantoral et al. en 1987 (Biotechnology 5: 494-497) y Díez et al. en 1987 (Curr. Genet. 12: 277-282) con ligeras modificaciones. En primer lugar se creció *P. chrysogenum* en el medio definido PM (Anné, J., (1997). Agricultura 25) con adición de extracto de levadura al 10% durante 18-21 horas a 25°C, se recuperó el micelio por filtración a través de un filtro de nylon y se lavó con 3-5 volúmenes de NaCl 0.9%. Tras secarlo entre papel de filtro, se resuspendió (100 mg/ml) en tampón de protoplastos. Cuando se consideró que la suspensión miceliar era homogénea, se le añadió un volumen de una solución de Caylasa (Cayla) 4 mg/ml en tampón de protoplastos y se incubó durante 3 horas a 25°C con agitación a 100 r.p.m. La aparición de protoplastos se siguió microscópicamente. En el momento en que la mayor parte de ellos se habían liberado, se separaron del micelio mediante filtración a través de un filtro de nylon de 30 µm de poro. La suspensión de protoplastos se lavó 3 veces con KCl 0.7 M centrifugando a 400xg durante 3 minutos entre cada lavado. Los protoplastos precipitados se resuspendieron en 10 ml de solución KCM y tras estimar su concentración mediante conteo en cámara Thoma, se ajustaron a  $1-5 \times 10^8$  protoplastos/ml con KCM. Seguidamente, se mezclaron cuidadosamente 100 µl de esta solución con 1-10 µg de DNA más 10 µl de PCM y la mezcla se incubó en baño de agua-hielo durante 20 minutos. A continuación se añadieron 500 µl de PCM y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos tras los cuales se adicionaron 600 µl de KCM. La selección de transformantes se realizó en base a la capacidad conferida por el gen de resistencia a fleomicina presente en los

- 17 -

plásmidos pALfleo7, pALP480 y pALPfleo1 para crecer en 30 µg/ml de fleomicina. Para ello, se mezclaron 200 µl de la reacción de transformación con 5 ml del medio Czapeck con adición de sorbitol (1 M) y fleomicina (30 µg/ml), extendiéndose seguidamente sobre una placa Petri con 5 ml del mismo medio. Las placas se incubaron a 25°C hasta ver la aparición de transformantes (4-8 días).

El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de *A. chrysogenum* fue el descrito por Gutiérrez et al. (1991). Mol. Gen. Genet. 225: 56-64. En primer lugar se creció la cepa de *A. chrysogenum* en el medio definido MMC durante 20-24 horas a 28°C, se recuperó el micelio por filtración a través de un filtro de nylon y se lavó con 3-5 volúmenes de NaCl 0.9%. Tras secarlo entre papel de filtro, se resuspendió (50 mg/ml) en tampón de protoplastos. Cuando se consideró que la suspensión miceliar era homogénea, se le añadió DTT 10 mM final y se incubó a 28°C y 150 r.p.m. durante 1 hora. Seguidamente se centrifugó a 12.000xg durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en 20 ml de tampón de protoplastos. Posteriormente se añadió un volumen de una solución de Caylasa (Cayla) 4 mg/ml en tampón de protoplastos y se incubó durante 3 horas a 25°C con agitación a 100 r.p.m. La aparición de protoplastos se siguió microscópicamente. En el momento en que la mayor parte de ellos se habían liberado, se separaron del micelio mediante filtración a través de un filtro de nylon de 25 µm de poro. La suspensión de protoplastos se lavó 3 veces con KCl 0.7 M centrifugando a 1.000xg durante 3 minutos entre cada lavado. Los protoplastos precipitados se resuspendieron en 10 ml de tampón NCM y tras estimar su concentración mediante conteo en cámara Thoma, se ajustaron a  $1-5 \times 10^8$  proto-

- 18 -

plastos/ml. Seguidamente, se mezclaron cuidadosamente 100 µl de esta solución con 1-10 µg de DNA y la mezcla se mantuvo en un baño de agua-hielo durante 20 minutos tras los cuales se adicionó 1 ml de CCM y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos más. La mezcla se centrifugó a 1.000xg durante 5 minutos y se resuspendió el sedimento en 800 µl de tampón NCM. La selección de transformantes se realizó en base a la capacidad conferida por el gen de resistencia a fleomicina presente en los plásmidos pALfleo7 y pALCfleo1 para crecer en 10 µg/ml de fleomicina. Para ello, se mezclaron 200 µl de la reacción de transformación con 5 ml del medio TSA con adición de sacarosa (0,3 M) y fleomicina (10 µg/ml), extendiéndose seguidamente sobre una placa Petri con 5 ml del mismo medio. Las placas se incubaron a 28°C hasta ver la aparición de transformantes (5-8 días).

En los transformantes obtenidos se analizó (I) la presencia de DNA correspondiente al plásmido utilizado en la transformación, (II) la existencia de transcrito correspondiente al gen testigo y (III) la actividad enzimática correspondiente al gen expresado. La obtención de DNA total se realizó de acuerdo con las condiciones descritas por Barredo et al. en 1994 (Patente española P9400931) y su posterior análisis se llevó a cabo por el método de Southern, según el procedimiento descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La purificación de RNA total se realizó según el método el descrito por Ausubel et al. en 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA). El RNA obtenido se almacenó precipitado en etanol a -20°C. Para su utiliza-

- 19 -

ción, se recuperó por centrifugación a 4°C y 10.000xg durante 20 minutos. La separación de las moléculas de RNA en base a su tamaño molecular se realizó por electroforesis en agarosa-formaldehído. Seguidamente el RNA se transfirió a  
5 filtro de nitrocelulosa y se hibridó con la sonda deseada, todo ello según el método descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La aparición de bandas de hibridación reveló la existencia de  
10 transcritos y por tanto la capacidad de expresión de un gen bacteriano en el hongo hospedadora: *P. chrysogenum* o *A. chrysogenum*. La actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa se valoró en los transformantes de acuerdo con el método descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La expresión del gen de resistencia  
15 a fleomicina se valoró en función del nivel de resistencia conferida a *P. chrysogenum* o *A. chrysogenum* en el medio sólido Czapeck tras su incubación a 25°C durante 7 días.

20 1.2.1. Expresión del gen *lacZ* de *E. coli* en *P. chrysogenum* y *E. coli* bajo el *Pgdh*.

El gen *lacZ* de *E. coli* se fusionó traduccionalmente con el *Pgdh* con la finalidad de expresarlo en *P. chrysogenum*. Para ello, entre los sitios *EcoRI* y *SalI* del plásmido pML1  
25 (Carramolino et al. 1989. Gene 77: 31-38) se subclonó el gen *lacZ*, generando el plásmido pMLac. Seguidamente, el *Pgdh* se introdujo entre los sitios *EcoRI* y *SmaI* de pMLac originando el plásmido pSKG (figura 5). Por último, el gen de resistencia a sulfonamida (Carramolino et al. 1989. Gene 77: 31-

- 20 -

38) se introdujo en el sitio *EcoRI* de pSKG dando lugar al plásmido pSKGSu (figura 5). En los transformantes de *P. chrysogenum* con el plásmido pSKGSu seleccionados por su resistencia a sulfonamida se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen *lacZ* por Northern. Posteriormente se midió la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa en aquellos transformantes positivos en los dos análisis anteriores. Los transformantes expresaron eficientemente el gen *lacZ* de *E. coli*, observándose que los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en aquellos que contenían una copia del plásmido integrada en su genoma eran superiores a los encontrados en transformantes monocopia que expresaban el gen *lacZ* bajo el control del promotor de gen triptófano C (*trpC*).

El plásmido pSKG se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $\Delta$ *lacZ*) con la finalidad de comprobar si el *Pgdh* de *P. chrysogenum* era también capaz de dirigir la expresión del gen *lacZ* en *E. coli*. Los transformantes obtenidos poseían la capacidad de generar colonias de color azul tras 10 días de incubación a 25°C en medio LB al que se había adicionado isopropil- $\beta$ -D-galactósido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal). Este resultado confirmó que la construcción *Pgdh-lacZ* expresa la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli*, si bien con menor eficiencia que el gen endógeno *lacZ* de *E. coli*.

#### 1.2.2. Expresión del gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus* en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* bajo el *Pgdh*.

El gen *ble<sup>R</sup>* carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol.

- 21 -

Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento *NcoI*-*ApaI* de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se subclonó en el plásmido pUT713 previamente digerido *NcoI*-*ApaI* obteniéndose el plásmido pALfleo5. El *Pgdh* se recuperó a partir de pALP25 como un fragmento *EcoRI*-*BamHI* de 726 pb, el cual fue seguidamente subclonado en pALfleo5 (previamente digerido *EcoRI*-*BamHI*) para generar pALfleo6. Este último plásmido posee un tamaño de 4,2 kb, el gen *ble<sup>r</sup>* expresado bajo el control del *Pgdh* y el gen de resistencia a ampicilina como marcador en *E. coli*. Con la finalidad de sustituir este último marcador por el gen de resistencia a cloranfenicol, a partir de pALfleo6 se purificó un fragmento de 1.900 pb *EcoRI*-*NotI* que incluía el *Pgdh*, *ble<sup>r</sup>* y el terminador del gen *trpC* (*TtrpC*) y se ligó al plásmido pBC KS (+) (Stratagene) digerido *EcoRI*-*NotI*. Como resultado se obtuvo el plásmido pALfleo7 (figura 5), el cual posee un tamaño de 5,4 kb y es portador del gen *ble<sup>r</sup>* de *S. hindustanus* bajo el *Pgdh* como marcador de selección en hongos, del gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en *E. coli* y del polilinker del plásmido pBC KS (+). La secuenciación de la región de fusión entre *Pgdh* y *ble<sup>r</sup>* confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

Con el plásmido pALfleo7 se realizaron transformaciones de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 30 µg/ml y 10 µg/ml de fleomicina respectivamente. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 100 µg/ml de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó por Southern la presencia

- 22 -

del plásmido y por Northern la existencia de transcrito correspondiente al gen *ble<sup>R</sup>*, obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* bajo el control del *Pgdh*.

El plásmido pALfleo7 se introdujo en *E. coli* con la finalidad de comprobar si el *Pgdh* de *P. chrysogenum* era también capaz de dirigir la expresión del gen *ble<sup>R</sup>* en *E. coli*. Los transformantes obtenidos poseían la capacidad de crecer en LB con 0,2 µg/ml de fleomicina, siendo menor de 0,025 µg/ml la concentración mínima inhibitoria de la fleomicina para *E. coli*. Este resultado confirmaba que el *Pgdh* se expresaba en *E. coli*, si bien con menor eficiencia que en *P. chrysogenum*. Un transformante de *E. coli* DH5α con el plásmido pALfleo7 está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT4849. La obtención de otros plásmidos como pALP784 y pALP785 a partir del plásmido depositado simplemente consiste en seleccionar por hibridación con el promotor del gen *gdh* incluido en pALfleo7, el fragmento de 2,9 kb Sau3AI-XbaI y subclonarlo en pBluescript I KS(+) o pUC13, respectivamente.

### 1.3. Expresión antisentido en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* bajo el promotor *gdh*.

La inactivación de la expresión génica en cepas industriales es en ocasiones necesaria para la eliminación de actividades enzimáticas indeseables. Debido a que el nivel de ploidía de muchas cepas industriales dificulta en la mayor parte de los casos el bloqueo de la expresión mediante disrupción génica directa, es necesaria la utilización de



- 23 -

sistemas de inactivación de expresión independientes del nivel de ploidía. El desarrollo de construcciones antisentido expresadas bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica.

5 A modo de ejemplo, a continuación se describe la utilización del *Pgdh* para la inactivación de la expresión del gen que codifica para fenilacetato 2-hidroxilasa (*pahA*) en *P. chrysogenum*. En primer lugar se construyó el plásmido pALP873, el cual es portador del *Pgdh* y del *TtrpC* fusionados  
10 mediante un sitio único *Bam*HI. El plásmido pALP873 se digirió *Bam*HI, se rellenaron sus extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se ligó con un fragmento de cDNA 1.053 pb interno al gen *pahA* obtenido a partir del plásmido pALP555 mediante digestión *Eco*RV. El plásmido resultante, denominado pALP874, se seleccionó por ser portador  
15 del fragmento del gen *pahA* antisentido respecto del *Pgdh*. A partir de este plásmido se purificó un fragmento *Eco*RI-*Xba*I de 2,5 kb portador del cassette antisentido, el cual se rellenó con Klenow y se subclonó en el sitio *Eco*RV del plásmido pALP874 originando el plásmido pALP888. Este último  
20 plásmido se caracteriza por poseer un tamaño de 7,9 kb y ser portador de (I) el cassette antisentido del gen *pahA* bajo el control del *Pgdh*, (II) el gen *ble<sup>R</sup>* como marcador de selección en hongos, (III) el gen de resistencia a cloranfenicol como  
25 marcador en *E. coli* y (IV) el polilinker del plásmido pBC KS (+).

Con el plásmido pALP888 se realizaron transformaciones de *P. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en función de su resistencia a 30 µg/ml de fleomicina. Entre  
30 los transformantes seleccionados, alrededor del 20 % mostraban una capacidad de oxidación de ácido fenilacético reduci-

- 24 -

da, careciendo algunos de ellos de niveles detectables de dicha actividad. En estos transformantes se analizó por Southern la presencia del plásmido y por Northern, utilizando como sonda un oligonucleótido correspondiente a la cadena codificante, la existencia de transcrito antisentido correspondiente al gen *pahA*. En ambos casos se obtuvieron resultados positivos, confirmando la posibilidad de bloquear, total o parcialmente, en *P. chrysogenum* actividades enzimáticas indeseables mediante la utilización de construcciones antisentido. Estos resultados son extrapolables a hongos filamentosos relacionados y a cualquier actividad enzimática, utilizando alguno de los promotores descritos en la presente patente (*Pgdh*, *Phex*, *PactPc* y *PactAc*) o cualquier otro disponible.

## 15 EJEMPLO 2

### 2.1. Clonación y caracterización del gen *hex* de *P. chrysogenum*.

En el micelio de *P. chrysogenum* procedente de fermentaciones industriales en condiciones de producción de penicilina G, se determinó la presencia de una proteína mayoritaria que una vez purificada y caracterizada resultó ser la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa. La secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína purificada se determinó por el método de degradación de Edman, obteniéndose dos secuencias diferentes:

(A) Ala-Pro-Ser-Gly-Ile-His-Asn-Val-Asp-Val-(His)-Val-Val-  
- (Asp)-Asn-(Asp)-Ala-(Asp)-Leu-Gln-Tyr-(Gly)

- 25 -

(B) Val-Gln-Val-Asn-Pro-Leu-Pro-Ala-Pro-(Arg)-(Arg)-Ile-(Thr)-???-(Gly)-(Ser)-(Ser)-(Gly)-(Pro)-(Ile/Thr)-???-(Val)

En función de estas secuencias y asumiendo la tendencia de utilización de codones existente en una serie de genes de *P. chrysogenum*, se diseñaron las siguientes combinaciones de oligonucleótidos sintéticos:

- (I) 5' TCGACGACGTGSACGTCSACGTTGTGGATGCC 3'  
(II) 5' CCGTAYTGSAGGTCRGCCTCGTTGTCTGACGAC 3'  
(III) 5' GGGGCVGGSAGVGGGTTGACYTG 3'

El gen *hex* de *P. chrysogenum* se clonó utilizando la genoteca y los procedimientos descritos en el ejemplo 1. Un total de 11 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen *hex* en un fragmento *SacI* de 3,2 kb y en otro *SalI* de 2,1 kb. La subclonación en ambas orientaciones del fragmento *SalI* en el plásmido pBC KS(+) (Stratagene) generó los plásmidos pALP295 y pALP303. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *hex* aparece en la figura 2.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen *hex* se utilizaron los plásmidos pALP295 y pALP303 anteriormente citados, así como pALP319 y pALP461 (ambas orientaciones de un fragmento *BamHI* de 2,8 kb), pALP388 y pALP389 (ambas orientaciones de un fragmento *SalI* de 2,4kb) y pALP377 y pALP378 (ambas orientaciones de un fragmento *PstI* de 1,2 kb) (figura 2). A partir de dichos plásmidos se construyeron una serie de clones por el método

- 26 -

"Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se secuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 La secuencia de 5.240 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:2) se analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de dos ORFs con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen *hex* se encontró en la posición 1.324 y el

10 codón de terminación TGA en la 3.112. Dicho ORF carece de intrones y codifica para una proteína de 66.545 Da y un punto isoeléctrico de 5,34 cuya secuencia de 596 aminoácidos (SEQ ID NO:6) posee un 49,0 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa de *Candida albicans*. Asimismo, la secuencia de aminoácidos deducida incluye, en las posiciones 19-40 y 99-120, las secuencias de aminoácidos determinadas químicamente a partir de la enzima purificada. Un lugar de reconocimiento de proteasa (Lys-Arg) aparece en las posiciones inmediatamente adyacentes a la secuencia de aminoácidos (A) anteriormente descrita (aminoácidos 97-98).

15

20

25

En la región promotora se encuentran dos zonas ricas en pirimidinas entre las posiciones 1.106-1.128 y 1.182-1.200, una presunta caja TATA en la posición 1.258 (ATAAATA) y una caja CAAT en la posición 1.163.

## 2.2. Expresión del gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus* en *P. chrysogenum* bajo el *Phex*.

Los procesos de: (I) transformación y selección de transformantes de *P. chrysogenum*, (II) análisis de DNA,

- 27 -

(III) análisis de RNA y (IV) mediciones enzimáticas se realizaron tal y como se describe en el apartado 1.2 del ejemplo 1.

Para expresar el gen *ble<sup>R</sup>* bajo el *Phex*, en primer lugar se construyó un sitio *NcoI* sobre el codón ATG que codifica para la metionina iniciadora del gen *hex*. Esto se realizó mediante PCR utilizando como "primers" los siguientes oligonucleótidos:

5' CTCCATGGTGATAAGGTGAGTGACGATG 3'

5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3' (Primer -20)

El fragmento de DNA obtenido por PCR se subclonó en ambas orientaciones en el sitio *SmaI* del plásmido pBC KS(+) (Stratagene) dando lugar a pALP427 y pALP428. Los insertos de ambos plásmidos fueron secuenciados utilizando los "dispositivo de ensayo -kit-s" "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De esta forma se comprobó que el *Phex* obtenido carecía de mutaciones e incluía el sitio *NcoI* sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína.

pALP427 fue el plásmido elegido para realizar la subclonación del gen *ble<sup>R</sup>*. El gen *ble<sup>R</sup>* carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento *NcoI*-*ApaI* de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se subclonó en el plásmido pALP427 (portador del *Phex*) previamente digerido *NcoI*-*ApaI* obteniéndose el plásmido pALP480 (figura 6). Este último plásmido posee un tamaño de 5,4 kb, el gen *ble<sup>R</sup>* expresado bajo el control del *Phex*, el terminador del gen *trpC* bajo el gen *ble<sup>R</sup>*, el gen de resistencia a clo-

- 28 -

ranfenicol como marcador en *E. coli* y el polilinker del plásmido pBC KS (+). La secuenciación de la región de fusión entre *Phex* y *ble<sup>r</sup>* confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

5 Con el plásmido pALP480 se realizaron transformaciones de *P. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 30 µg/ml de fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido,  
10 obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 100 µg/ml de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen *ble<sup>r</sup>* por Northern, obteniéndose resultados  
15 positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en *P. chrysogenum* bajo el control del *Phex*. Un transformante de *E. coli* DH5α con el plásmido pALP480 está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso  
20 CECT4852. La obtención de los plásmidos pALP295, pALP319, pALP377 y pALP388 a partir del plásmido depositado simplemente consiste en seleccionar por hibridación, con el promotor del gen *hex* incluido en pALP480, los siguientes fragmentos de ADN: 2,1 kb *SalI*, 2,8 kb *BamHI*, 1,2 kb *PstI* y 2,4 kb  
25 *SalI*, respectivamente y, a continuación, subclonarlos en pBluescript I KS(+).

2.3. Producción extracelular de proteínas en *P. chrysogenum* utilizando el gen *hex*.

- 29 -

La enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa es una proteína abundantemente secretada por *P. chrysogenum* al medio de cultivo en fermentadores industriales en condiciones de producción de penicilina G. La capacidad de esta enzima para ser secretada posibilita la utilización del gen *hex* para la expresión y secreción de proteínas homólogas o heterólogas en *P. chrysogenum* u hongos filamentosos relacionados.

La enzima posee una secuencia señal de secreción compuesta por los siguientes aminoácidos: Met-Lys-Phe-Ala-Ser-Val-Leu-Asn-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Ala (aminoácidos 1 a 18 de SEQ ID NO: 6). En general, los péptidos señal poseen tres dominios estructurales conservados (Taki-  
zawa, N. et al. (1994) Recombinant microbes for industrial and agricultural applications. Murooka, Y. And Imanaka, T. (eds). Marcel Dekker, Inc. New York): (I) una región amino terminal cargada positivamente denominada "n", la cual generalmente posee de 1 a 5 residuos y se requiere para la traslocación eficiente de la proteína a través de la membrana (Met-Lys), (II) una región hidrofóbica denominada "h", compuesta por 7 a 15 residuos (Phe-Ala-Ser-Val-Leu-Asn-Val-Leu) y (III) una región polar en el extremo carboxilo denominada "c", compuesta por 3 a 7 residuos (Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Ala). La preproteína sintetizada intracelularmente se procesa por un sitio de corte compuesto por dos residuos básicos (Lys-Arg, aminoácidos 97 y 98 de SEQ ID NO: 6) generando una proteína madura.

Existen dos posibilidades a la hora de expresar y secretar proteínas utilizando el gen *hex*: (I) fusionar en marco de lectura la región promotora, incluyendo la secuencia señal de secreción, a la región codificante del gen a expresar y (II) fusionar en marco de lectura el gen *hex* completo

- 30 -

a la región codificante del gen a expresar. Utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA; Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA), cualquier experto en el arte podría utilizar el promotor, incluyendo la secuencia de secreción del gen *hex*, o bien el gen completo, para la expresión y secreción de proteínas de interés en *P. chrysogenum* u hongos filamentosos relacionados.

### EJEMPLO 3

#### 3.1. Clonación y caracterización del gen *act* de *P. chrysogenum*.

El gen *act* de *P. chrysogenum* se clonó utilizando la genoteca y los procedimientos descritos en el ejemplo 1. En este caso la hibridación se realizó con un fragmento *NcoI*-*ClaI* de 888 pb procedente del gen *act* de *A. nidulans* (Fidel et al. (1988). Gene 70: 283-293). Un total de 10 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen *act* en fragmentos *BamHI* de 5,2 kb, *EcoRI* de 4,9 kb y *HindIII* de 5,9 kb. El fragmento *HindIII* fue subclonado en ambas orientaciones en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generando los plásmidos pALP298 y pALP299. La subclonación en ambas orientaciones del fragmento *EcoRI* en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generó los plásmidos pALP315 y pALP316. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *act* aparece en la figura 3.



- 31 -

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen *act* se utilizaron los plásmidos pALP315 y pALP316 anteriormente citados. A partir de dichos plásmidos se construyeron una serie de clones por el método "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se secuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 2.994 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:3) se analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen *act* se encontró en la posición 494 y el codón de terminación TAA en la 2.250. Dicho ORF posee 5 intrones en las posiciones 501-616, 649-845, 905-1046, 1078-1180 y 1953-2021 y codifica para una proteína de 41.760 Da y un punto isoeléctrico de 5.51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:7) posee un 98,1 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína  $\gamma$ -actina de *A. nidulans*. En la región promotora se encuentran dos extensas zonas ricas en pirimidinas entre las posiciones 356-404 y 418-469, una presunta caja TATA en la posición 259 (TATAAAAAT) y cuatro cajas CAAT en las posiciones 174, 217, 230 y 337.

### 3.2. Expresión del gen *ble<sup>R</sup>* en *P. chrysogenum* bajo el *PactPc*.

Para expresar el gen *ble<sup>R</sup>* bajo el *PactPc*, en primer lugar se construyó un sitio *NcoI* sobre el codón ATG que codifica para la metionina iniciadora del gen *hex*. Esto se

- 32 -

realizó mediante PCR utilizando como "primers" los siguientes oligonucleótidos:

5' CTCCATGGTGACTGATTAAACAAGGGAC 3'

5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3' (Primer -20)

5 El fragmento de DNA obtenido por PCR se subclonó en ambas orientaciones en el sitio *Sma*I del plásmido pBC KS(+) (Stratagene) dando lugar a pALPact1 y pALPact2. Los insertos de ambos plásmidos fueron secuenciados utilizando los "dispositivo de ensayo -kit-s" "Borrar una base -Erase a base-" 10 (Promega) y "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De esta forma se comprobó que el *PactPc* obtenido carecía de mutaciones e incluía el sitio *Nco*I sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína.

15 pALPact1 fue el plásmido elegido para realizar la subclonación del gen *ble*<sup>R</sup>. El gen *ble*<sup>R</sup> carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento *Nco*I-ApaI de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se 20 subclonó en el plásmido pALPact1 (portador del *PactPc*) previamente digerido *Nco*I-ApaI obteniéndose el plásmido pALPfleo1 (figura 6). Este último plásmido posee el gen *ble*<sup>R</sup> expresado bajo el control del *PactPc*, el terminador del gen *trpC* bajo el gen *ble*<sup>R</sup>, el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en *E. coli* y el polilinker del plásmido pBC KS 25 (+). La secuenciación de la región de fusión entre *PactPc* y *ble*<sup>R</sup> confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

Con el plásmido pALPfleo1 se realizaron transformacio- 30 nes de *P. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en

- 33 -

función de su capacidad de resistencia a 30 µg/ml de fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más  
5 de 100 µg/ml de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen *ble<sup>r</sup>* por Northern, obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confir-  
10 maron la posibilidad de expresar genes heterólogos en *P. chrysogenum* bajo el control del *PactPc*. Un transformante de *E. coli* DH5α con el plásmido pALP315, el cual es portador del gen *act*, está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT4851. La  
15 obtención del plásmido pALP316 a partir del plásmido depositado pALP315 simplemente consiste en subclonar el inserto pALP315 en el lugar *EcoRI* de pBluescript I KS(+) en la orientación opuesta.

#### EJEMPLO 4

##### 20 4.1. Clonación y caracterización del gen *act* de *A. chrysogenum*.

Con la finalidad de clonar el gen *gdh* de *A. chrysogenum*, se construyó una genoteca en el vector fágico (GEM12 tal y como se describe en el apartado 1.1 del ejemplo 1. El  
25 título fágico obtenido fue de 50 ufp/µl (25.000 ufp totales) en *E. coli* LE392 y de 41 ufp/µl (20.500 ufp totales) en *E. coli* NM539. Esto significaba que alrededor del 82 % de los

- 34 -

fagos eran portadores de un fragmento de DNA exógeno y que se había obtenido una genoteca *A. chrysogenum* con una probabilidad del 99.999 %. Una vez realizadas esta serie de comprobaciones teóricas, se infectó *E. coli* NM539 y la genoteca completa se extendió sobre 3 placas Petri de 150 mm de diámetro (alrededor de 7.000 ufp/placa Petri), se recogió en 50 ml de SM más 2.5 ml de cloroformo y se guardó a 4°C. De esta forma se disponía de un volumen suficientemente amplio y representativo de fagos recombinantes (2.100 ufp/ $\mu$ l) listos para ser plaqueados en cualquier momento.

Alrededor de 20.000 ufps fueron extendidas sobre 2 placas Petri de 150 mm de diámetro y seguidamente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (BA85, 0,45  $\mu$ m, Schleicher & Schuell). Dichos filtros se hibridaron utilizando protocolos estándar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) con un fragmento *Nco*I-*Cla*I de 888 pb correspondiente al gen *act* de *A. nidulans*. Un total de 5 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen *act* en un fragmento *Hind*III de 8,7 kb. Este fragmento fue subclonado en ambas orientaciones en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generando los plásmidos pALC52 y pALC53. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen *act* aparece en la figura 4.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen *act* se utilizaron los plásmidos pALC52 y pALC53 anteriormente citados. A partir de dichos plásmidos se construyeron una serie de clones por el método "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se se-

- 35 -

cuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 3.240 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:4) se analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen *act* se encontró en la posición 787 y el codón de terminación TAA en la 2.478. Dicho ORF posee 5 intrones en las posiciones 794-920, 952-1.123, 1.180-1.289, 1.321-1.410 y 2.183-2.249 y codifica para una proteína de 41.612 Da y un punto isoeléctrico de 5.51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:8) posee un 98,4 % y un 98,1 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de las proteínas  $\gamma$ -actina de *A. nidulans* y *P. chrysogenum* respectivamente. En la región promotora se encuentra una zona rica en pirimidinas entre las posiciones 607-654, una presunta caja TATA en la posición 747 (TTATAAAA) y una caja CAAT en la posición 338.

#### 4.2. Expresión del gen *ble<sup>r</sup>* en *A. chrysogenum* bajo el PactAc.

Con la finalidad de expresar el gen *ble<sup>r</sup>* bajo el control del PactAc, se construyó el plásmido pALCfleol (figura 6), el cual incluye el gen *ble<sup>r</sup>* expresado bajo el control del PactAc, el terminador del gen *trpC* bajo el gen *ble<sup>r</sup>*, el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en *E. coli* y el polilinker del plásmido pBC KS (+).

El gen *ble<sup>r</sup>* carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento NcoI-ApaI de 1.100

- 36 -

pb. Seguidamente este fragmento se fusionó en marco de lectura con el PactAc aprovechando que el gen *act* posee un sitio *NcoI* sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína. Para ello, el gen *ble<sup>R</sup>* se subclonó en el plásmido pALCact1 (portador del PactAc) previamente digerido *NcoI*-*ApaI* obteniéndose el plásmido pALCfleol (figura 6). La secuenciación de la región de fusión entre PactAc y *ble<sup>R</sup>* confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

Con el plásmido pALCfleol se realizaron transformaciones de *A. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 10 µg/ml de fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 30 µg/ml de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen *ble<sup>R</sup>* por Northern, obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en *A. chrysogenum* bajo el control del PactAc. Un transformante de *E. coli* DH5α con el plásmido pALC52, el cual es portador del gen *act*, está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT4850. La obtención del plásmido pALC53 a partir del plásmido depositado pALC52 simplemente consiste en subclonar el inserto pALC52 en el lugar *HindIII* de pBluescript I KS(+) en la orientación opuesta.

- 37 -

La introducción en actinomicetos, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* o *Saccharomyces* de los insertos presentes en los plásmidos depositados utilizando de hospedador a *E. Coli*, es tan solo cuestión de rutina técnica y de la elección de los vectores más apropiados para la transformación de dichos géneros o familias.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Mapa de restricción del gen *gdh* de *P. chrysogenum*, el cual codifica para la actividad enzimática glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4).

Figura 2.- Mapa de restricción del gen *hex* de *P. chrysogenum*, el cual codifica para la actividad enzimática  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52).

Figura 3.- Mapa de restricción del gen *act* de *P. chrysogenum*, el cual codifica para  $\gamma$ -actina.

Figura 4.- Mapa de restricción del gen *act* de *A. chrysogenum*, el cual codifica para  $\gamma$ -actina.

Figura 5.- Vectores para la expresión del gen *lacZ* de *E. coli*, del gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus* y del fragmento antisentido del gen *pahA* de *P. chrysogenum* en *P. chrysogenum* y/o *A. chrysogenum* bajo el promotor *Pgdh*.

Figura 6.- Vectores para la expresión del gen *ble<sup>R</sup>* de *S. hindustanus* en *P. chrysogenum* y/o *A. chrysogenum* bajo los promotores *Phex*, *PactPc*, *PactAc*.

- 38 -

## LISTADO DE SECUENCIAS

## INFORMACION GENERAL:

## SOLICITANTE:

NOMBRE: ANTIBIOTICOS, S.A.U.  
CALLE: Avda. de Burgos, 8-A  
CIUDAD: Madrid  
ESTADO O PROVINCIA: Madrid  
PAIS: España  
CODIGO POSTAL: 28036  
TELEFONO: 91-3841200  
FACSIMIL: 91-3841220

TITULO: "PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA,  
 $\beta$ -N-ACETILHEXOSAMINIDASA Y  $\gamma$ -ACTINA Y SU UTILI-  
ZACION EN SISTEMAS DE EXPRESION, SECRECION Y  
ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS".

NUMERO DE SECUENCIAS: 8

## DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

DESTINATARIO: ANTIBIOTICOS, S.A.U.  
CALLE: Avda. de Burgos, 8-A  
CIUDAD: Madrid  
ESTADO O PROVINCIA: Madrid  
PAIS: España  
CODIGO POSTAL: 28036

## FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE MEDIO: DISCO 3.5"  
ORDENADOR: PC  
SISTEMA OPERATIVO: WINDOWS  
SOPORTE LOGICO: WORD



- 39 -

## INFORMACION SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

NOMBRE: ALBERTO DE ELZABURU

NUMERO DE REGISTRO: 232/1

DIRECCION: Miguel Angel, 21

28010 - Madrid

## INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACIONES:

TELEFONO: 3085900

FACSIMIL: 3193810

TELEX O CORREO ELECTRONICO: elzaburu@elzaburu.es

## INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 1

## CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2816 pares de bases

TIPO: nucléotidos

NÚMERO DE HEBRAS: 2

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO

ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*

FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP784 y pALP785

POSICION EN EL GENOMA: desconocida

## CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

SITUACIÓN: unión (922...970, 1131...1261, 1319...2521

## CARACTERÍSTICA:

NOMBRE CLAVE: intrón

SITUACION: 971...1130

## CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 1262...1318

## CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: gen gdh

- 40 -

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

GATCGCCGTT	TATGGGATAG	TGGGCACGTG	ACAGAGCCTG	CAGCCGAGTC	AAATTGCCGA	60
AGTTGGCAGT	TGGTGGCGGA	GAAGTCGAGA	TTTTATTTGC	GTTTATTTTCG	TTTATTTTCGA	120
TTTTAGTTTT	CCTATTTTTTC	CTATTTTGGT	TGATTCCATC	CAACTTTATA	GGATACTACT	180
TCATAATAGG	TCGATCATAG	TACAAGCACC	AACTCGTCGC	ATCATGCATT	TTCTGGGGTT	240
CGAATTCTTT	ACTTAGAGTA	AGGTTTCTCT	CAGCCTCCTA	ATAAACTACC	TAGGTAGGTT	300
AAATTTACTT	TTTAACATTT	TATTTATTCA	GAAGATTGTC	GGAGAGGACC	GATCCGAAGG	360
ACACGAATTG	AACACGGAAG	GGATATTAGG	GACAAGGAAG	ATTTAGGGAT	AAAAAACGA	420
GCTGTGATTG	ATGGGAAGGT	TAAAGTGTAG	TAATGAAGGT	GATGGGACCA	AAAGGAGTGG	480
GAGAGATAAG	CCAAATTCTG	TGCAAATTCT	GTGACCTTAA	ACCATAAGAT	AACATTGTTC	540
GGGCCCCGAA	CTTCGGACGT	TCTTCCCACG	GAAAGGCAA	TCATTGGGTT	TCATCGATTG	600
TCTTGGATCT	TTATCCTAAT	TCCCCGTGCA	ACCTGGTCTT	GGGGATTATT	GTCGACTTGT	660
AGGCGCATTA	ACCCATCTCC	CGTCTTCCCT	CCAATCAATC	CCGGATTCTC	TCGTCCGACT	720
CCGGCTTCGA	CTCTCTCTCT	CTCCACATCT	CTATCAATT	GTACACTCCC	CCATCCCATT	780
CTTTTCTTCT	CTTCTCATCT	ACTCTCTTGA	ATCTCAATTG	TCTTAATACT	CTCTCTGCTC	840
TTGTCTTTAT	TTATAATTTA	TTAGATCACT	GCTTAGCATT	GATCTACTTA	CCTAAAAGCA	900
GAGTTAACAG	TACCGGCCGA	A ATG ATG CAA AAC CTT CCC TTC GAG CCT GAG				951
		Met Met Gln Asn Leu Pro Phe Glu Pro Glu				
		1 5 10				
TTC GAG CAG GCC TAC AAG G	GTATGTCTCT	TTTAATTTTT	CCCTTTCTTA	TTTCAA		1006
Phe Glu Gln Ala Tyr Lys						
		15				
TTCCATATCG	TCCATATCAC	ACACTATTTT	CCGACTCAAT	TCCTTTACCC	ATCGGCATCT	1066
TCCCGGCCCTT	TGGCTCCACC	GGGGGCATAA	TTTCGGGGTG	ACTCAGCTAA	CAATCCCGAA	1126
ACAG AG CTC GCC TCC ACT CTC GAG AAC TCC ACT CTT TTC CAG AAG AAG						1174
Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys Lys						
		20 25 30				
CCC GAG TAC CGC AAG GCT CTT CAG GTC TCT GTC CCC GAG CGT GTT						1222
Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Gln Val Ser Val Pro Glu Arg Val						
		35 40 45				
ATT CAG TTC CGT GTT GTC TGG GAA GAT GAC AAA GGC CAG GTAAGACCTT						1271
Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Lys Gly Gln						
		50 55 60				
TCTTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC						1327
				Val Gln Ile		
AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG						1375
Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys						
		65 70 75				
GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC						1423
Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe						
		80 85 90 95				
CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG						1471
Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met						
		100 105 110				
GGC GGT GGT AAG GGT GGA TCC GAC TTC GAC CCC AAG GGC AAG ACC GAT						1519
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Thr Asp						
		115 120 125				
AAC GAG ATC CGC CGC TTC TGT GTC TCC TTC ATG ACC GAG CTG TGC AAG						1567
Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe Met Thr Glu Leu Cys Lys						
		130 135 140				
CAC ATC GGT GCC GAC ACC GAT GTT CCC GCC GGT GAT ATC GGT GTG ACC						1615
His Ile Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Thr						
		145 150 155				

- 41 -

GGC CGC GAG GTT GGT TTC ATG TTC GGC CAG TAC AAG AAG ATC CGC AAC	1663
Gly Arg Glu Val Gly Phe Met Phe Gly Gln Tyr Lys Lys Ile Arg Asn	
160 165 170 175	
CAG TGG GAG GGT GTC CTC ACC GGT AAG GGT GGC AGC TGG GGT GGT TCC	1711
Gln Trp Glu Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gly Ser	
180 185 190	
CTC ATC CGC CCC GAG GCC ACC CGC TAC GGT GTC GTC TAC TAC GTC GAG	1759
Leu Ile Arg Pro Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Val Val Tyr Tyr Val Glu	
195 200 205	
CAC ATG ATC CAG CAC GCC TCC GGC GGC AAG GAA TCC TTC GCT GGT AAG	1807
His Met Ile Gln His Ala Ser Gly Gly Lys Glu Ser Phe Ala Gly Lys	
210 215 220	
CGC GTC GCC ATC TCC GGT TCC GGA AAC GTC GCC CAG TAC GCC GCT CTC	1855
Arg Val Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu	
225 230 235	
AAG GTC ATC GAG CTC GGT GGC TCC GTC ATC TCC CTC TCC GAC TCC CAG	1903
Lys Val Ile Glu Leu Gly Gly Ser Val Ile Ser Leu Ser Asp Ser Gln	
240 245 250 255	
GGT GCT CTC GTC CTG AAC GGC GAG GAG GGC TCC TTC ACC GCT GAG GAG	1951
Gly Ala Leu Val Leu Asn Gly Glu Glu Gly Ser Phe Thr Ala Glu Glu	
260 265 270	
ATC AAC ACC ATC GCT GAG ATC AAG GTC CAG CGC AAG CAG ATC GCC GAG	1999
Ile Asn Thr Ile Ala Glu Ile Lys Val Gln Arg Lys Gln Ile Ala Glu	
275 280 285	
CTC GCT ACC CAG GAC GCC TTC AGC TCC AAG TTC AAG TAC ATC CCC GGT	2047
Leu Ala Thr Gln Asp Ala Phe Ser Ser Lys Phe Lys Tyr Ile Pro Gly	
290 295 300	
GCC CGC CCC TGG ACC AAC ATC GCC GGC CGC ATC GAT GTC GCT CTC CCC	2095
Ala Arg Pro Trp Thr Asn Ile Ala Gly Arg Ile Asp Val Ala Leu Pro	
305 310 315	
TCC GCC ACC CAG AAC GAG GTC TCC GGC GAT GAG GCC AAG GCT CTC ATC	2143
Ser Ala Thr Gln Asn Glu Val Ser Gly Asp Glu Ala Lys Ala Leu Ile	
320 325 330 335	
GCC GCT GGC TGC AAG TTC ATC GCT GAG GGC TCC AAC ATG GGT TCC ACC	2191
Ala Ala Gly Cys Lys Phe Ile Ala Glu Gly Ser Asn Met Gly Ser Thr	
340 345 350	
CAG GAG GCT ATC GAT GTC TTC GAG GCC CAC CGT GAT GCC AAC CCT GGT	2239
Gln Glu Ala Ile Asp Val Phe Glu Ala His Arg Asp Ala Asn Pro Gly	
355 360 365	
GCC GCT GCC ATC TGG TAC GCC CCT GGT AAG GCC GCC AAC GCT GGT GGT	2287
Ala Ala Ala Ile Trp Tyr Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly	
370 375 380	
GTT GCC GTC TCT GGT CTC GAG ATG GCC CAG AAC TCT GCC CGT GTC AAC	2335
Val Ala Val Ser Gly Leu Glu Met Ala Gln Asn Ser Ala Arg Val Asn	
385 390 395	
TGG TCC CGT GAG GAG GTT GAC TCC CGT CTT AAG AAG ATT ATG GAG GAC	2383
Trp Ser Arg Glu Glu Val Asp Ser Arg Leu Lys Lys Ile Met Glu Asp	
400 405 410 415	
TGC TTC AAC AAC GGT CTC TCT ACT GCT AAG GAG TAT GTC ACC CCT GCT	2431
Cys Phe Asn Asn Gly Leu Ser Thr Ala Lys Glu Tyr Val Thr Pro Ala	
420 425 430	
GAG GGT GTT CTT CCT TCC CTC GTG GCT GGC TCC AAC ATT GCT GGT TTC	2479
Glu Gly Val Leu Pro Ser Leu Val Ala Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe	
435 440 445	

- 42 -

ACC AAG GTC GCT GAG GCC ATG AAG GAG CAC GGT GAC TGG TGG TAAATTAGTC 2531  
 Thr Lys Val Ala Glu Ala Met Lys Glu His Gly Asp Trp Trp  
 450 455 460  
 GCATCCCCAT TTATTCTGGG AGGTGTTCTG TGACGATTTC TGTCTCTCT TAAGGAGAGG 2591  
 CAGCTTTGAT GCATTTTCTT TTCATTTAAA TAGCTTTTAA CCCTTTTGT CAAGCGGGTT 2651  
 ACGGATAGAG GCGCTTGGTT TTCTCCACTG TTGCATTCTGA TTGATATCCC CACTTGAGCA 2711  
 CCGCTGTTTG TTTTGGTCT GCACTTGGGA CTGTCATGAT GATAATGAGA TACAATGAAT 2771  
 AACTTAAAAA TAATTGTGTG GTCTCGTAAA GTTGTAAGT CTAGA 2816

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 2

## CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 5240 pares de bases  
 TIPO: nucléotidos  
 NÚMERO DE HEBRAS: 2  
 CONFIGURACIÓN: lineal  
 TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico  
 HIPOTETICA: NO  
 ANTI-SENTIDO: NO  
 FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*  
 FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP295 y pALP388  
 POSICION EN EL GENOMA: desconocida  
 CARACTERÍSTICA:  
 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante  
 SITUACIÓN: 1324...3111  
 CARACTERISTICA:  
 OTRAS INFORMACIONES: gen hex

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

GTCGACCTCG CAACAGTCGA GAAGCACGCC GCCTATCTCG CCCGCAGCGG GGTAACCGGC 60  
 CTAGTAACCC AGGGTAGCAA TGGCGAAGCC GTCCACCTAG ACCGGGAAGA ACGCAAGGCC 120  
 ATCACAGCCG CCACACGCCG CGCCGTGGAC GCAGCCGGCT ACAGCAACAT GCCGGTGATT 180  
 GCCGGCTGTG GCGCCGCCTC AACCCTGTGAG ACCATCCAAT TCTGCCAGGA CTCCGGTGCA 240  
 GCAGGCGCCG ACGCTGTCTT CGTGCTCCCA CCCAGCTACT ACAAGTCCCT CGTGAGCACC 300  
 GAGTCCATGC ACGCCCACTT CCGGGCTGTG GCCGATGCCT CGCCCGTCCC TGTCCTCATC 360  
 TACAACTTCC CCGGCGTGCA GTCCGGCCTC GATCTCAGCT CAGATGATAT CTTAACTCTC 420  
 GCAGAACACC CCAATATCAT CGGCTGTAAAG CTCACGTGCG GCAACACGGG TAAGTTGGCT 480  
 CGTGTGTGCG CGGCCAAGCC GGATTTCTTG ACTTTTGGTG GCTCGGCCGA TTTCACGCTG 540  
 CAGACGCTGG TTGTTGGTGG GCGGGGATT ATCGGTGGCG TGGCTAACAT GATTCCTCGC 600  
 TCGTGTGTGC GTCTGATGGA GTTGTATCGT GCTGGGAAGG TTCAGGAGGC GCAGAAGGTG 660  
 CAGGCTATTG TTGCGCGCGC TGAATGGGCT GCTATCCATG GTGGCTTTAT CGCTGTAAAG 720  
 ACGGGCCTCC AAGCCTACCA CGGTTACGGT GGTCTTCCTC GGCGGCCTTG TGTCGTGCCT 780  
 TCTGCTAAGG ATGCGGCAGC CATTAGGAG GAGTTCCGGG AGGGAATGGA GCTGGAGAAG 840

- 43 -

TCGTTGGAGT	CCTAATGGAT	ATAGTAGATT	AAATCATGAT	TACCAGAGAT	CCCATGTGGA	900
GATTTCTATT	CCTTTCCAGG	GGTTTCCAG	GGGTTTTCCA	GATGTTTCC	AGGTGTTTTC	960
CAAATGTTTC	AGGTTGCTTC	ATAGATCGAC	AGACCGGTGT	GACTGTGTCA	TTTGCCAGTA	1020
GATCCGGAGA	TCCCGTAGCT	TTCCCCCTCT	TTATCTTTTA	ATATTTGTTG	TTATATGGGA	1080
GTTCAAGTTG	CATGTAGAGG	TTGCACTCTC	TCTCTCTCTC	TTTCCCTTGA	ATTATTTGAG	1140
TCCAAGGTGT	GTTAGTTGTA	TGCAATGTAA	CTAGGGAGCT	GTTTGTTTTT	CCCCTTCCCC	1200
AGGGTTGCAT	CCTGGGCCAT	TCCCCATTCC	GATGAAAGAT	CGACAATGCA	GCTAAACATA	1260
AATAGTTCTG	GTTATCTCCT	GGCCACAGTT	TCTCTACTTT	TCATCGTCAC	TCACCTTATC	1320
AAC ATG AAG TTC GCC TCG GTG TTG AAT GTG CTC GGG GCC CTG ACG GCT	Met Lys Phe Ala Ser Val Leu Asn Val Leu Gly Ala Leu Thr Ala					1368
1	5	10	15			
GCG TCC GCC GTC CAA GTG AAT CCA CTT CCC GCC CCC CGT AAC ATC ACC	Ala Ser Ala Val Gln Val Asn Pro Leu Pro Ala Pro Arg Asn Ile Thr					1416
20	25	30				
TGG GGA TCC TCC GGT CCA ATC CAA GTC AAC AAC TTG AAT CTC AAC GGT	Trp Gly Ser Ser Gly Pro Ile Gln Val Asn Asn Leu Asn Leu Asn Gly					1464
35	40	45				
CCT CAC TCC CCT TTG CTC ACT CAA GCT TGG GAG CGA GCA TGG GAA ACC	Pro His Ser Pro Leu Leu Thr Gln Ala Trp Glu Arg Ala Trp Glu Thr					1512
50	55	60				
ATC ACC ACC CTG CAA TGG GTT CCT GCT GCT GTT GAA TCC CCA ATC GCC	Ile Thr Thr Leu Gln Trp Val Pro Ala Ala Val Glu Ser Pro Ile Ala					1560
65	70	75				
TCC TAT CCG GCC TTC CCC ACC TCG ACC CCT GTC TCC TCT GCC CCC AAG	Ser Tyr Pro Ala Phe Pro Thr Ser Thr Pro Val Ser Ser Ala Pro Lys					1608
80	85	90				
GCC AAA CGC GCG CCC TCC GGA ATC CAT AAC GTC GAT GTT CAT GTG GTG	Ala Lys Arg Ala Pro Ser Gly Ile His Asn Val Asp Val His Val Val					1656
100	105	110				
GAC AAC GAT GCC GAT CTC CAA TAC GGT GTG GAT GAA TCC TAT ACA CTG	Asp Asn Asp Ala Asp Leu Gln Tyr Gly Val Asp Glu Ser Tyr Thr Leu					1704
115	120	125				
GTA GTG AGC GAT GGT GGC ATC AGG ATC AAT TCT CAG ACG GTC TGG GGT	Val Val Ser Asp Gly Gly Ile Arg Ile Asn Ser Gln Thr Val Trp Gly					1752
130	135	140				
GTG TTG CAG GCA TTC ACC ACC CTG CAG CAG ATT ATC ATC TCG GAT GGG	Val Leu Gln Ala Phe Thr Thr Leu Gln Gln Ile Ile Ile Ser Asp Gly					1800
145	150	155				
AAG GGC GGT TTG ATC ATT GAA CAG CCC GTC AAG ATC AAG GAT GCC CCG	Lys Gly Gly Leu Ile Ile Glu Gln Pro Val Lys Ile Lys Asp Ala Pro					1848
160	165	170				
CTG TAC CCC CAT CGT GGT ATC ATG ATA GAC ACC GGG CGC AAC TTC ATT	Leu Tyr Pro His Arg Gly Ile Met Ile Asp Thr Gly Arg Asn Phe Ile					1896
180	185	190				
ACC GTT CGC AAG CTC CTT GAG CAG ATC GAC GGT ATG GCC CTG TCC AAG	Thr Val Arg Lys Leu Leu Glu Gln Ile Asp Gly Met Ala Leu Ser Lys					1944
195	200	205				
CTC AAT GTT CTC CAC TGG CAC TTG GAC GAT TCT CAG TCG TGG CCC ATG	Leu Asn Val Leu His Trp His Leu Asp Asp Ser Gln Ser Trp Pro Met					1992
210	215	220				
CAG ATG AGC TCC TAC CCG GAG ATG ACC AAA GAT GCT TAC TCG CCT CGC	Gln Met Ser Ser Tyr Pro Glu Met Thr Lys Asp Ala Tyr Ser Pro Arg					2040
225	230	235				
GAA ATC TAC ACC GAG CAC GAC ATG CGC CGC GTG ATT GCC TAC GCA CGC	Glu Ile Tyr Thr Glu His Asp Met Arg Arg Val Ile Ala Tyr Ala Arg					2088
240	245	250				
		255				

- 44 -

GCG CGA GGT GTC CGC GTC ATC CCC GAG GTC GAC ATG CCC GCC CAC TCA	2136
Ala Arg Gly Val Arg Val Ile Pro Glu Val Asp Met Pro Ala His Ser	
260 265 270	
GCC TCC GGC TGG CAG CAG GTC GAC CCG GAG ATC GTG GCA TGT GCC GAA	2184
Ala Ser Gly Trp Gln Gln Val Asp Pro Glu Ile Val Ala Cys Ala Glu	
275 280 285	
TCC TGG TGG TCG AAC GAC GTT TGG GCG GAG CAC ACC GCC GTC CAG CCG	2232
Ser Trp Trp Ser Asn Asp Val Trp Ala Glu His Thr Ala Val Gln Pro	
290 295 300	
AAC CCT GGC CAG CTC GAC ATT ATC TAC CCC AAG ACC TAC GAA GTT GTC	2280
Asn Pro Gly Gln Leu Asp Ile Ile Tyr Pro Lys Thr Tyr Glu Val Val	
305 310 315	
AAC AAT GTC TAC CAG GAA TTG TCT CGC ATC TTC AGC GAC AAC TTG TTC	2328
Asn Asn Val Tyr Gln Glu Leu Ser Arg Ile Phe Ser Asp Asn Leu Phe	
320 325 330 335	
CAC GTT GGT GCA GAC GAG ATC CAG CCC AAC TGC TAC AAC TAC AGC ACC	2376
His Val Gly Ala Asp Glu Ile Gln Pro Asn Cys Tyr Asn Tyr Ser Thr	
340 345 350	
CAT ATC ACT AAG TGG TTT GCC GAG GAT CCC TCG CGC ACC TAC AAC GAC	2424
His Ile Thr Lys Trp Phe Ala Glu Asp Pro Ser Arg Thr Tyr Asn Asp	
355 360 365	
CTT GCG CAG TAC TGG GTT GAC CAT TCC ATG CCC ATC TTC CGT AGT GTC	2472
Leu Ala Gln Tyr Trp Val Asp His Ser Met Pro Ile Phe Arg Ser Val	
370 375 380	
GGC GAC CAC CGC CGT CTT ATG ATG TGG GAG GAC ATA GCT ATC GCG ACT	2520
Gly Asp His Arg Arg Leu Met Met Trp Glu Asp Ile Ala Ile Ala Thr	
385 390 395	
GAA AGC GCC CAC GAC GTG CCC AAA GAC GTC ATC ATG CAG ACC TGG AAC	2568
Glu Ser Ala His Asp Val Pro Lys Asp Val Ile Met Gln Thr Trp Asn	
400 405 410 415	
AGC GGC GAG GGT GAG GGT AAC ATC AAG AAA CTC ACC TCC GCC GGC TAC	2616
Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asn Ile Lys Lys Leu Thr Ser Ala Gly Tyr	
420 425 430	
GAC GTT GTC GTT TCG ACC TCC GAT TTC CTC TAC CTC GAC TGC GGG CGC	2664
Asp Val Val Val Ser Thr Ser Asp Phe Leu Tyr Leu Asp Cys Gly Arg	
435 440 445	
GGC GGC TAT GTC ACC AAC GAC GCC CGC TAC AAC GTG CAG AGC AAC ACC	2712
Gly Gly Tyr Val Thr Asn Asp Ala Arg Tyr Asn Val Gln Ser Asn Thr	
450 455 460	
GAC GGC GGA GTG AAC TTC AAC TAC GGC GGC GAC GGT GGC TCC TGG TGC	2760
Asp Gly Gly Val Asn Phe Asn Tyr Gly Gly Asp Gly Gly Ser Trp Cys	
465 470 475	
GCC CCC TAC AAG ACC TGG CAG CGC ATC TAC GAC TAC GAC TTC CTC ACG	2808
Ala Pro Tyr Lys Thr Trp Gln Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Phe Leu Thr	
480 485 490 495	
AAT CTC ACT TCC TCC GAA GCG AAG CAC ATT ATC GGC GCC GAG GCT CCT	2856
Asn Leu Thr Ser Ser Glu Ala Lys His Ile Gly Ala Glu Ala Pro	
500 505 510	
TTG TGG TCG GAG CAG GTC GAC GAT GTG ACC GTC TCC AGC GTG TTC TGG	2904
Leu Trp Ser Glu Gln Val Asp Asp Val Thr Val Ser Ser Val Phe Trp	
515 520 525	
CCT CGC GCT GCT GCT CTG GGT GAG CTT GTC TGG TCT GGT AAC CGT GAC	2952
Pro Arg Ala Ala Ala Leu Gly Glu Leu Val Trp Ser Gly Asn Arg Asp	
530 535 540	
GCT GCG GGT AGA AAG CGT ACC ACC AGC TTT ACT CAG CGT ATT CTG AAC	3000
Ala Ala Gly Arg Lys Arg Thr Thr Ser Phe Thr Gln Arg Ile Leu Asn	
545 550 555	

- 45 -

TTC CGT GAA TAC CTC GTT GCC AAT GGT GTG ATG GCT ACT GCT CTT GTG	3048
Phe Arg Glu Tyr Leu Val Ala Asn Gly Val Met Ala Thr Ala Leu Val	
560 565 570 575	
CCG AAG TAT TGT CTG CAG CAC CCT CAT GCT TGC GAC CTC TAT AAA AAC	3096
Pro Lys Tyr Cys Leu Gln His Pro His Ala Cys Asp Leu Tyr Lys Asn	
580 585 590	
CAG ACT GTA ATG TCT TGATTGTGGT TAAGCTGGAC TGCTAGTGAG CCTTACAAC	3151
Gln Thr Val Met Ser	
595	
GCCTGTTCGT CTGTATATAC TTATTCTATC TTCGATACCC AATTCCATTG GAATTTCTTC	3211
CAGGATACAT GTCCCTGATC AGTATACCAT TTCACGTCCA CATTCAATCT TCAGCAACAC	3271
GAATTTATCC AAACCAATCA CCACCCTAGA TCTACCACAA CACTACCTTT ATACATATCT	3331
ACTTGATACC CAATCCCATT CCAACCAGGC GCAAAAGGCG TGCCCAGTCC AAATCAAAAT	3391
CAGCCCCCG AGCCCAACCC TCTCCACATA TCCATACCCT AATCAAAATC ACCTTAATCT	3451
AAACAAATCC ATCACGCCCCA AGGACCCAC AGACCTCCCC TTCCCAACCC ACCCAGTCCA	3511
CCTCCACAAA CCAAACCCCA AATCAGAACT GCCGTGCAAC TCTCCGTCTT AGAACTCGCC	3571
CTTCGGTCCC GTCCCGAAT TAGATGGGCT TCGGGACGGC TTGCTGTATG CACTATGCAT	3631
GTAGTACGGA GTACGCCGTA CACATGTAGT AGGGGATATA TGTATGTACT ATGTACGCAT	3691
GTTTCGAGTAC GCAGTACGTA GTGTGGCATG CAGGTCAGCT AGCATTGGCA GTAGCATATA	3751
CGGCATAACC TACGCTATGC ATCTAATATT CTTCGGTATA TACCACATGG TACGGAATTA	3811
GATGCAATAC ATGTACATGT ACATGTGCAT ACCTAGGTAC AAAGTGAATC TCGTTATTGT	3871
ATGTCTAGTC GTGTATAAGT GTAGTCCCAT GTCATATATA CAAGCCCATA CCGCATCGGA	3931
GCAAACCAGC CCATTCAGAC ATCCCTGCTC GAAACCCAGT CTACGGATTG AGACCGGGCT	3991
GAGCTGGGGT TTGGGTGTTG CTGCATGCGT ACGCCTACAT ACGTAGGGAG ATATGTTGCA	4051
CAGGATGCAG GGAATGACAA ATTGACGAAT TGAGAAATAC GCGAGTGTT AGATGTTAAT	4111
TCTCGTTCGG GATGTTTATG TTTACCTAGG TATACTGGCT GGGGGGTCGT CATAACGTC	4171
GGAATTTGTG GCAATCTGTC AGTGGCCAGG TCCTTGTTTG ATTTATATGT TTGGGATGGG	4231
GATGGTCAAT GGGTATTCCA AGGAGGATGT ATCATCTGCT TTACACCGTC CCTTGCCTGG	4291
GATTTGGATT GAATTCCTCT TTCCACGTCG ATGTAGATTC TTCCCCGGAG CTATTCGGGT	4351
ACAACCCCTGG CTTCATATA TCATGTGTCC ATACTAAGTA CAGACGCTTC GATTTCCGGT	4411
GCTGCGAGTA GATCGGGAAC TGATCTCGCA TGTCTGTACA CGAAGGGTTG TACAAGCAGC	4471
CGGTGCTTCT GCGTAACCGG TTGTTTATGT TATTGGATTT GGTATTCGTC TAATATGGAT	4531
GATTTGGGAT AAGCTTCTAT CCTGGGAATG GGTGCTTGGT ATAGTTCAGC CTAGTACTTC	4591
GTCTTCTATG TGATATTTCC AAAATAGTAG TTTTCGGTAA GTATATCTCC TACCTTTGAC	4651
TTTGGTTTGT GGTTTACGTC TTACCTGGCG TTTAGAGGGA GGGATAGGTT TCTGTATCAC	4711
CGTCGTGTTT CAACGTGGAT CGGGGTCCTT TCCCTGATAT ATATCTTGGC TTATGTTTCG	4771
TGCGGTAGTG CGGGTTCGTA TAATGCATGT CTGGTATATC ATACGGCATT AGTGACTGGG	4831
ACGTTGAGGT CGAGCTTGGT TTGAGGTTAC ATATATTGAG CCAAAATGGT CGAAAATATA	4891
TATCAACATT GCCAAAACAG AACTTCATTC GTTGGATGCC ATGCCAAAT GCTAATAGGT	4951
CTTGATCTTA CTCTGACTCC TATCTCATCT CACCTTGGTT ATTCTGTTACA CAGCATTAAC	5011
CCCAAGAACC AGGTATAGTC TGATCGTGGA TGTGGGCCAC GACAAAATAG AAGGTCTCGT	5071
GTTTAGGGCG ACGAATCTGG GACTGCATTC CAGACGGGCC TGCGGAGAAT TTGCAGCATT	5131
TTATATCTAC ATGGTTGTTT CCTGGTGTGT GTGGGTGTTT CATGATATAT CCTGGTCGAT	5191
TCTGACGTGC GTATGTATCG CTGGAAGGC TCGTAGGGGC TCGCTCGAC	5240

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 3

## CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2994 pares de bases

TIPO: nucléotidos

NÚMERO DE HEBRAS: 2

- 46 -

CONFIGURACIÓN: lineal  
TIPO DE MOLECULA: ADN genómico  
HIPOTETICA: NO  
ANTI-SENTIDO: NO  
FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*  
FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP315 y pALP316  
POSICION EN EL GENOMA: desconocida  
CARACTERÍSTICA:  
NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante  
SITUACIÓN: unir (494..500, 617..647, 846..901,  
1047..1077, 1181..1952, 2022..2249)  
CARACTERISTICA:  
NOMBRE CLAVE: intrón  
SITUACION: 501..616  
CARACTERÍSTICA:  
NOMBRE/CLAVE: intrón  
SITUACION: 648..845  
CARACTERISTICA:  
NOMBRE/CLAVE: intrón  
SITUACION: 902..1046  
CARACTERISTICA:  
NOMBRE/CLAVE: intrón  
SITUACION: 1078..1180  
CARACTERISTICA:  
NOMBRE/CLAVE: intrón  
SITUACION: 1953..2021  
CARACTERÍSTICA:  
OTRAS INFORMACIONES: gen act

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 3

GAATTCAGCA	GCCTACGGAG	TCCATAAGAC	ACCAAGACAC	AGCCATTGTA	TGGATTATAT	60
ATGCCATGTA	TGCTGACAA	TGCTGTATAA	GTACTGTAAT	ACAAGGTAAA	CCCCCAACCC	120
GGTCAAGGTA	CGTGTTCCTG	CCGTACCCAA	AAGGGTCCCC	AAGAATGTCC	ACGCAATACT	180
TTTAGGTAGA	CATTGAAGGA	ATCCAAGTGA	GAAATTCAAT	GAACATGAAC	AATAGTTCTG	240
CCTTATAATC	TTTATAAGTA	TAAAAATCAG	AAAGAGAATT	ATATACAAAA	GGGTAGATCT	300
GGAGGGGGTT	CAGAGTTAAG	GCCTCAGGCA	GGCGCACAA	CCCAGCCATC	ACAAAACCCCT	360
CTCCACTCTT	CCCTCTCTCT	CTCTTCCTTC	TTCCTTTCTC	CCCTAATCCC	AACTATATCC	420



- 47 -

CCTCTAACCT	CTTTCCATCT	TTCTTTTCTT	TTTTCCCCTC	TTCTCCCCTA	AGTCCCTTGT	480
TTAATCAGTC	ACA ATG GAG G	GTATGTTATT	CCAGTTGTGG	CCACATCAGC	AGCTTCCC	538
	Met Glu					
	1					
CGGAAGCTCC	CCCCCCTGTT	GGCCACAGCT	TCGATTCCAT	ATTTGCGAAT	GACAACTAAC	598
CCGTATATCT	CATTATAG	AA GAA GTT GCT GCT CTC GTC ATC GAC AAT GG				647
		Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp Asn Gly				
	5		10			
GTATGTGCTA	TACTTTTCCC	CGGAGCTTCT	GGCTTGTGTT	GGGGTCGCCA	ACTCAGCCCC	707
GGTCGCAGTC	GTTGCCACCC	CTAATCCGCC	CGCGACGGCA	GATGGAATCC	ATCCCAATGG	757
CTTTCCATCT	CGTCCACAA	CTACCAGAGG	GTGATCCAAA	GACTACAAGA	ACTATGATAC	827
TGATTATTTG	CGATATAG T	TCG GGT ATG TGT AAG GCC GGT TTC GCC GGT GAC				879
		Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp				
	15		20			
GAC GCA CCA CGA GCT GTT TTC C	GTAAGTCCA	ACCCACAGA	ATATGACACC			930
Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe						
25	30					
CCTCCTGTGC	GAAGGCCGCC	ATCCCACCAA	CCCTTGCCTC	GGATGGCTTC	CCCTCTTTTG	990
CTTGGCTAGG	AGGAACCTGG	AACCTAGGAA	ATCAAATAAC	TGACAAAATT	CAACAG	1046
CT TCC ATT GTC GGT CGT CCC CGC CAC CAT GG	GTAATGATC	CCCCCTTTT				1097
Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His His Gly						
35	40					
TTTCCGGCTC	GTTTCGGCTG	TATACGCTAT	ACGCAGCCAA	TTTGATCCCT	AATGAACCAA	1157
AAAGAATACT	AACATGGGCG	CAG T ATT ATG ATT GGT ATG GGT CAG AAG GAC				1208
		Ile Met Ile Gly Met Gly Gln Lys Asp				
		45				
TCG TAC GTT GGT GAT GAG GCA CAG TCG AAG CGT GGT ATC CTC ACG CTC						1256
Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu						
55	60					
CGT TAC CCT ATT GAG CAC GGT GTT GTC ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG						1304
Arg Tyr Pro Ile Glu His Gly Val Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu						
70	75					
AAG ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAC GAG CTC CGT GTT GCC CCC GAA						1352
Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu						
85	90					
GAG CAC CCC ATT CTC TTG ACC GAA GCT CCC ATC AAC CCC AAG TTC AAC						1400
Glu His Pro Ile Leu Leu Thr Glu Ala Pro Ile Asn Pro Lys Phe Asn						
100	105					115
CGT GAG AAG ATG ACC CAG ATC GTG TTC GAG ACC TTC AAC GCC CCC GCC						1448
Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Val Phe Glu Thr Phe Asn Ala Pro Ala						
120	125					130
TTC TAC GTC TCC ATC CAG GCC GTT CTG TCC CTG TAC GCC TCC GGT CGT						1496
Phe Tyr Val Ser Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg						
135	140					145
ACC ACT GGT ATC GTT CTC GAC TCC GGT GAC GGT GTC ACC CAC GTC GTC						1544
Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Val Val						
150	155					160
CCC ATC TAC GAG GGT TTC TCT CTG CCC CAC GCT ATC TCG CGT GTC GAC						1592
Pro Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Leu Pro His Ala Ile Ser Arg Val Asp						
165	170					175
ATG GCT GGC CGT GAT CTG ACC GAC TAC CTG ATG AAG ATC CTC GCT GAG						1640
Met Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Ala Glu						
180	185					195
CGT GGT TAC ACT TTC TCC ACC ACC GCC GAG CGT GAA ATC GTC CGT GAC						1688
Arg Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp						
200	205					210

- 48 -

ATC AAG GAG AAG CTT TGC TAC GTC GCC CTC GAC TTC GAG CAG GAG ATC	1736
Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Ile	
215 220 225	
CAG ACC GCT TCC CAG AGC TCC AGC CTC GAG AAG TCC TAC GAG CTT CCC	1784
Gln Thr Ala Ser Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro	
230 235 240	
GAT GGA CAG GTC ATC ACT ATT GGC AAC GAG CGC TTC CGT GCT CCT GAG	1832
Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Ala Pro Glu	
245 250 255	
GCT CTG TTC CAG CCT AAC GTT CTT GGC CTC GAG TCT GGC GGT ATC CAC	1880
Ala Leu Phe Gln Pro Asn Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly Gly Ile His	
260 265 270 275	
GTC ACC ACC TTC AAC TCC ATC ATG AAG TGT GAT GTT GAT GTC CGT AAG	1928
Val Thr Thr Phe Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Val Arg Lys	
280 285 290	
GAT CTC TAC GGC AAC ATT GTC ATG GTAAGAAAA AGCCTCCAGA GCTGATGTTG	1982
Asp Leu Tyr Gly Asn Ile Val Met	
295	
CGCAAAGATC CCCACTAACA TACAATCCT TTTTTTTAG TCT GGT GGT ACC ACC	2036
Ser Gly Gly Thr Thr	
300	
ATG TAC CCC GGT ATC TCC GAC CGT ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCT CTT	2084
Met Tyr Pro Gly Ile Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu	
305 310 315 320	
GCT CCT TCT TCC ATG AAG GTC AAG ATC ATC GCT CCC CCC GAG CGC AAG	2132
Ala Pro Ser Ser Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys	
325 330 335	
TAC TCC GTC TGG ATC GGT GGA TCC ATT CTG GCC TCC CTG TCG ACC TTC	2180
Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe	
340 345 350	
CAG CAG ATG TGG ATC TCC AAG CAG GAG TAC GAC GAG AGC GGT CCT TCC	2228
Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser	
355 360 365	
ATC GTT CAC CGC AAG TGC TTC TAAGCTTCTT GCAGCACTTT ACTACTCGTA	2279
Ile Val His Arg Lys Cys Phe	
370 375	
TTCGCTCGTA CTTTCCTGGT GIATCAAAAA GCAGGATGGA GGCCTGGTG GATTGCAAGC	2339
GTGTTGGAC TCGATTATC AAGCGGATAG CCTGAAAATG GAATCTCGAT TTTAGTGGAA	2399
TAGAGTCGGT CGTTTTCTTT TTGTTACTCT TTACCTTACT CTTTACTCGA TCTCTATCCA	2459
TCCATTTCTG CTTTGAACCA TTTCACCTTT ACTCCATCTT TTTCCCTTTC CTCATTGCGA	2519
TCCGCTGTCC CGTCCACCTC TCTGATTGTT TTGCCTGGAC GGGTCTCTGG CGATGCGGCA	2579
TCAACAGTGT ACCTGTAGGG CAAGGATGTA TATGGAGTTG GTTGGCTATA GGGATTAGGT	2639
TGCGTTGTCC TTTTCGACGT CTTCTACGTC TTTGTTCTAG CCCCTTGCGT TGTCTTCAAC	2699
TAAACTGCCC TTGTCCGTAG CTTTTAACGT GACTTTGACT TCAAATATTC CACTGGTTCC	2759
TTGTATTCTG CTAGAAACGC TGGTTCAACG CTTGTTGAAT GTCTTCTATG TCCAACATCT	2819
ACAAGACGTA TCCGAGAAGA CAACAAAAG GCTCTGAGGA AAGTCTACTA AAAACTTGGC	2879
CAGGCCGGAT TAGGCCTTTG TCATGGTTAT TGTACTGTCA TTCGATCAGT CCATATTGAT	2939
ATTCTGGGAA TATGTAGGCT GACGAGATAA ATGGCACGCA TTGGGTGTGT ATCTT	2994

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 4

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 3240 pares de bases

TIPO: nucléotidos

- 49 -

NÚMERO DE HEBRAS: 2  
 CONFIGURACIÓN: lineal  
 TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico  
 HIPOTÉTICA: NO  
 ANTI-SENTIDO: NO  
 FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*  
 FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALC52 y pALC53  
 POSICION EN EL GENOMA: desconocida  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante  
   SITUACIÓN: unir (787..793, 921..951, 1124..1179,  
                   1290..1320, 1411..2182, 2250..2477)  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: intrón  
   SITUACION: 794..920  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: intrón  
   SITUACION: 952..1123  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: intrón  
   SITUACION: 1180..1289  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: intrón  
   SITUACION: 1321..1410  
 CARACTERÍSTICA:  
   NOMBRE/CLAVE: intrón  
   SITUACION: 2183..2249  
 CARACTERÍSTICA:  
   OTRAS INFORMACIONES: gen act

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

GCCAGGCTGG	CACCGGCCTG	CCTTGATGCG	AGATGCCTAC	TCGTACTATG	CCTACAGGTA	60
TGGGCTTTCC	GCGTGTCGTC	AGCTTGCGAC	CGCGCGGCTG	CTGACGACCC	AAGGCAAGCT	120
GGTAACATGG	CGGCACGAAA	TTTCTCTCTG	CCTGCTCGTC	CTCTTGGTGT	GGAGGGGTAC	180
GAGTGCAGGT	ATGATGGGAC	GGCAGAGGAG	TGACGGAGGC	TGTGCGGTTG	GCACGAGTAC	240
TGTACGAGTA	CTCGTACTGT	AGGTGCAGCG	ACTGTGGTGG	TACTGCTAGG	TGGAATTGGG	300
TCCAGCAGGC	ATGCAGCTCC	CAGCCACCGT	CGTTAACCAA	TCAGTTAAAG	CAGCAACGCA	360
ACCCGCCCCC	GTTTTTCTGC	CAGAAATTTG	GGCGGTGTCG	TGCCCCCAGT	CGCTGTTGCC	420
CGCCCTTGTC	TGGTCGCCTA	CAGGCTGCAC	CACAGGTAAC	AACAGCCCGC	CCCAGGTCCT	480

- 50 -

TGTAGGTGCC CAGTGAGTGC CCGGTGCCCCA CAAGTTTCTC GTGGCATCCA CTGGCGGACT 540  
 TGGAAGCCCCA TCAGTGATGC TTCCCTCCTT TCCCCCTCCA CATCTCACTC AGCTCACGCA 600  
 AGCCAACCCCT CTCTCCCCC GTCTCCATTC CATCTTCTTC TCTCCACGAC CCTTAAGAGT 660  
 CCCTCCTGCT CACGTGAC ATCCTTCGCT CCCAGCCCCA CGACATCTGC ATCGTCTGGG 720  
 CTTCTTGACA CTCTGTCAAT TCTTCCTTAT AAAACCTCTT TACCGCTCTT CCCGTAATCC 780  
 GACGCC ATG GAG G GTACGTGTCG CCGCAACGCA CTCCCGCTTC CCCTACTACC CTA 837  
 Met Glu  
 1  
 TCGCGC ATCCACACGG CGCCGCGATG CCTAGCCATC GCGAGGGTGC ATCGCAACGA CTT 896  
 GGCTAAC TGTTCCTTCG TTCACAG AG GAG GTC GCC GCC CTC GTT ATC GAC 946  
 Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp  
 5 10  
 AAT GG GTAAGCTCGC CCGCTGTCTC ACCGACATCC ATCGTCCCCC TGGCCTCTGT 1001  
 Asn Gly  
 CGAGATGGGA GCCTCCAGGG GTCCCTTCGA CGAGCGCGTC GATTGCCAAA ATCCAACGAG 1061  
 ATCGGGCCAT ACTGAGCCGA CACTCGTGTG TTTTCTGGAC ATTAGGACTG ACTTGATTCT 1121  
 AG T TCG GGT ATG TGC AAG GCC GGT TTC GCC GGT GAT GAT GCT CCC CGA 1169  
 Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg  
 15 20 25  
 GCT GTT TTC C GTAAGTACCC CACTTCCACC CGTCGAGCTC CCAATTGTC CACCGCCAGG 1229  
 Ala Val Phe  
 30  
 GCGAGAAGGG GGCAGAACGG GGCAAACTGC ATCGCAAACA TGGCTAATTC GATGCGACAG 1289  
 CG TCC ATT GTC GGT CGT CCC CGC CAC CAT GG GTAAGTTTCC GGCCGCAGCC 1340  
 Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His His Gly  
 35 40  
 GACACCTCTC ACCCCCCCCC GGGGGGCTCC TAAGCGAGTC AGCGCTGGTT CTGACCGCTG 1400  
 GATACTATAG C ATC ATG ATC GGC ATG GGC CAG AAG GAC TCG TAC GTC GGT 1450  
 Ile Met Ile Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly  
 45 50 55  
 GAC GAG GCT CAG TCC AAG CGT GGT ATC CTC ACC CTG CGC TAC CCC ATT 1498  
 Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Ile  
 60 65 70  
 GAG CAC GGT GTT GTC ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAG ATC TGG CAC 1546  
 Glu His Gly Val Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His  
 75 80 85  
 CAC ACC TTC TAC AAC GAG CTG CGT GTT GCC CCC GAG GAG CAC CCG GTC 1594  
 His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val  
 90 95 100  
 CTG CTC ACC GAG GCG CCC ATC AAC CCC AAG TCC AAC CGT GAG AAG ATG 1642  
 Leu Leu Thr Glu Ala Pro Ile Asn Pro Lys Ser Asn Arg Glu Lys Met  
 105 110 115  
 ACC CAG ATC GTC TTC GAG ACC TTC AAC GCC CCT GCC TTC TAC GTC TCC 1690  
 Thr Gln Ile Val Phe Glu Thr Phe Asn Ala Pro Ala Phe Tyr Val Ser  
 120 125 130 135  
 ATC CAG GCC GTC CTG TCA CTG TAC GCC TCC GGC CGT ACG ACC GGT ATC 1738  
 Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile  
 140 145 150  
 GTC CTG GAC TCT GGT GAT GGT GTC ACC CAC GTT GTC CCC ATC TAC GAG 1786  
 Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Val Val Pro Ile Tyr Glu  
 155 160 165  
 GGT TTC GCC CTG CCC CAC GCC ATT GCC CGT GTC GAC ATG GCT GGT CGT 1834  
 Gly Phe Ala Leu Pro His Ala Ile Ala Arg Val Asp Met Ala Gly Arg  
 170 175 180  
 GAT CTC ACC GAC TAC CTC ATG AAG ATC CTG GCC GAG CGC GGC TAC ACC 1882  
 Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Ala Glu Arg Gly Tyr Thr  
 185 190 195

- 51 -

TTC TCC ACC ACG GCC GAG CGT GAG ATT GTC CGT GAC ATC AAG GAG AAG Phe Ser Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys 200 205 210 215	1930
CTC TGC TAC GTC GCC CTC GAC TTC GAG CAG GAG ATC CAG ACT GCC GCC Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Ile Gln Thr Ala Ala 220 225 230	1978
CAG AGC TCC AGC CTG GAG AAG TCC TAC GAG CTT CCC GAC GGC CAG GTC Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val 235 240 245	2026
ATC ACC ATT GGC AAT GAG CGC TTC CGT GCT CCC GAG GCT CTC TTC CAG Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Ala Pro Glu Ala Leu Phe Gln 250 255 260	2074
CCC TCC GTC CTG GGT CTC GAG AGC GGC GGC ATC CAC GTC ACC ACC TTC Pro Ser Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly Gly Ile His Val Thr Thr Phe 265 270 275	2122
AAC TCC ATC ATG AAG TGC GAC GTC GAT GTC CGT AAG GAT CTG TAC GGC Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Val Arg Lys Asp Leu Tyr Gly 280 285 290 295	2170
AAC ATT GTC ATG GTAAGTCAGA TGCCGGGCCT GGAAGACACC TCATTTAGGA TCT Asn Ile Val Met	2225
TGCTAAC ACCAATTTTT TTTTGTAG TCT GGT GGT ACC ACC ATG TAC CCT GGC Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro Gly 300 305	2276
CTC TCT GAC CGT ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCT CTT GCT CCT TCT TCC Leu Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Ser 310 315 320	2324
ATG AAG GTC AAG ATC ATT GCT CCC CCG GAG CGC AAG TAC TCC GTC TGG Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys Tyr Ser Val Trp 325 330 335 340	2372
ATC GGT GGT TCC ATT CTG GCG TCT CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp 345 350 355	2420
ATC TCG AAG CAG GAG TAC GAC GAG AGC GGC CCC TCC ATC GTC CAC CGC Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His Arg 360 365 370	2468
AAG TGC TTC TAAGGTATGT TGTCGTGGG AAGCCGGATA CCCGAATGTA AGGTTGACAG Lys Cys Phe 375	2527
GTTTCGAAAAG ACAAGGCAAC CGGCCAGAAC CAAATCCTTC CACCCTCCGC AAAAGAACGC CAAGATGTCG GAGTCGGTGG CGACCGATGC AACGTCTACT CACGTGCGCG CGTATCCCAC TCAAGTCTCA TATTTACGAA AAGTTATTTT ACATGGTCAG GCGGTGGTGG GCGTTGCCTT TTCTCGGAAC AGACATGACG GCGGCCACTT TTGTAGTCGG ATGCGTTTAG GGATGCGAGC CTAGGGGTGT AGGAAGCTGA GGTGATATA CAATAACTTT TTTTGCTTTC CGTTCTAGAC TCGTTCAATG GGAAGACGTG ACGGAATCGC TTGGCTGTCT AATAGCCAGC TTGATCAGGC GAGTCGGGTG GTTGTGTTTC GATGTTGAGA GGTGCACCAG CGTATTTGTA TGGCCGAGGT AGGTATTATG GTCTCGTATT TGCAACACTA GAGCTCGCTT GCTCGTTTTT ACCAGCAGTG TCCTCTGCCA TCGCGCGGCT CCGACTCTCG TCTGGCTTCT CAGACCGTGC CTCGTCAATA GTATTATCCC CGGTAGTAAC CTCCGCACTA GCCGGTTCTT TGTCGTCTTC CTGCTCGCCG ATGAGCTTCC TGTACTGCG CCTCTTCTTC TTGTCGGCGC TGGCAGCCCT CTTCTGCTTG ATGCGCCCGA CCATGGCGGA CCGGCTCTGC TCCCCGTTGA GCAGCTCGTC GAC	2587 2647 2707 2767 2827 2887 2947 3007 3067 3127 3187 3240

- 52 -

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 5

## CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 461 aminoácidos

TIPO: aminoácidos

NÚMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*

## CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: secuencia de aas del enzima  
glutamato deshidrogenasa (EC.1.4.1.4) de 49837 Da  
de peso molecular

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

Met	Met	Gln	Asn	Leu	Pro	Phe	Glu	Pro	Glu	Phe	Glu	Gln	Ala	Tyr	1	5	10	15
Lys	Glu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr	Leu	Phe	Gln	Lys	20	25	30	35
Lys	Pro	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Ser	Val	Pro	Glu	40	45	50	55
Arg	Val	Ile	Gln	Phe	Arg	Val	Val	Trp	Glu	Asp	Asp	Lys	Gly	Gln	60	65	70	75
Val	Gln	Ile	Asn	Arg	Gly	Tyr	Arg	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Ala	Leu	80	85	90	95
Gly	Pro	Tyr	Lys	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	His	Pro	Thr	Val	Asn	Leu	100	105	110	115
Ser	Ile	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly	Phe	Glu	Gln	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	120	125	130	135
Leu	Thr	Gly	Leu	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Asp	Phe	140	145	150	155
Asp	Pro	Lys	Gly	Lys	Thr	Asp	Asn	Glu	Ile	Arg	Arg	Phe	Cys	Val	160	165	170	175
Ser	Phe	Met	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	His	Ile	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	180	185	190	195
Val	Pro	Ala	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Gly	Phe	200	205	210	215
Met	Phe	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ile	Arg	Asn	Gln	Trp	Glu	Gly	Val	220			
Leu	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Trp	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Arg	Pro				
Glu	Ala	Thr	Gly	Tyr	Gly	Val	Val	Tyr	Tyr	Val	Glu	His	Met	Ile				
Gln	His	Ala	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Arg	Val				

- 53 -

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Ala	Gln	Tyr	Ala	Ala	Leu	Lys	
				230					235					240	
Val	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Asp	Ser	Gln	
				245					250					255	
Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Glu	
				260					265					270	
Glu	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Arg	Lys	Gln	Ile	
				275					280					285	
Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Gln	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Lys	Phe	Lys	Tyr	
				290					295					300	
Ile	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Asp	
				305					310					315	
Val	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Thr	Gln	Asn	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Glu	
				320					325					330	
Ala	Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Cys	Lys	Phe	Ile	Ala	Glu	Gly	
				335					340					345	
Ser	Asn	Met	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Glu	Ala	
				350					355					360	
His	Arg	Asp	Ala	Asn	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Tyr	Ala	Pro	
				365					370					375	
Gly	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	
				380					385					390	
Met	Ala	Gln	Asn	Ser	Ala	Arg	Val	Asn	Trp	Ser	Arg	Glu	Glu	Val	
				395					400					405	
Asp	Ser	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Met	Glu	Asp	Cys	Phe	Asn	Asn	Gly	
				410					415					420	
Leu	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Tyr	Val	Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Val	Leu	
				425					430					435	
Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Gly	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	
				440					445					450	
Ala	Glu	Ala	Met	Lys	Glu	His	Gly	Asp	Trp	Trp					
				455					460						

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 6

CARACTERISTICA DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 596 aas

TIPO: Aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

CARACTERISTICA:

OTRA INFORMACION: Secuencia de aas del enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52) de 66545 Da de peso molecular.

- 54 -

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

Met	Lys	Phe	Ala	Ser	Val	Leu	Asn	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	1	5	10	15
Ala	Ser	Ala	Val	Gln	Val	Asn	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg	Asn	Ile	20	25	30	
Thr	Trp	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Ile	Gln	Val	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	35	40	45	
Asn	Gly	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Leu	Thr	Gln	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	50	55	60	
Trp	Glu	Thr	Ile	Thr	Thr	Leu	Gln	Trp	Val	Pro	Ala	Ala	Val	Glu	65	70	75	
Ser	Pro	Ile	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ala	Phe	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	80	85	90	
Ser	Ser	Ala	Pro	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro	Ser	Gly	Ile	His	Asn	95	100	105	
Val	Asp	Val	His	Val	Val	Asp	Asn	Asp	Ala	Asp	Leu	Gln	Tyr	Gly	110	115	120	
Val	Asp	Glu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Asp	Gly	Gly	Ile	Arg	125	130	135	
Ile	Asn	Ser	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr	Thr	140	145	150	
Leu	Gln	Gln	Ile	Ile	Ile	Ser	Asp	Gly	Lys	Gly	Gly	Leu	Ile	Ile	155	160	165	
Glu	Gln	Pro	Val	Lys	Ile	Lys	Asp	Ala	Pro	Leu	Tyr	Pro	His	Arg	170	175	180	
Gly	Ile	Met	Ile	Asp	Thr	Gly	Arg	Asn	Phe	Ile	Thr	Val	Arg	Lys	185	190	195	
Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Asp	Gly	Met	Ala	Leu	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	200	205	210	
Leu	His	Trp	His	Leu	Asp	Asp	Ser	Gln	Ser	Trp	Pro	Met	Gln	Met	215	220	225	
Ser	Ser	Tyr	Pro	Glu	Met	Thr	Lys	Asp	Ala	Tyr	Ser	Pro	Arg	Glu	230	235	240	
Ile	Tyr	Thr	Glu	His	Asp	Met	Arg	Arg	Val	Ile	Ala	Tyr	Ala	Arg	245	250	255	
Ala	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Ile	Pro	Glu	Val	Asp	Met	Pro	Ala	His	260	265	270	
Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Gln	Gln	Val	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Ala	Cys	275	280	285	
Ala	Glu	Ser	Trp	Trp	Ser	Asn	Asp	Val	Trp	Ala	Glu	His	Thr	Ala	290	295	300	
Val	Gln	Pro	Asn	Pro	Gly	Gln	Leu	Asp	Ile	Ile	Tyr	Pro	Lys	Thr	305	310	315	
Tyr	Glu	Val	Val	Asn	Asn	Val	Tyr	Gln	Glu	Leu	Ser	Arg	Ile	Phe	320	325	330	
Ser	Asp	Asn	Leu	Phe	His	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Ile	Gln	Pro	Asn	335	340	345	
Cys	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Thr	His	Ile	Thr	Lys	Trp	Phe	Ala	Glu	Asp	350	355	360	
Pro	Ser	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	Leu	Ala	Gln	Tyr	Trp	Val	Asp	His	365	370	375	
Ser	Met	Pro	Ile	Phe	Arg	Ser	Val	Gly	Asp	His	Arg	Arg	Leu	Met	380	385	390	



- 55 -

Met Trp Glu Asp	Ile Ala Ile Ala Thr	Glu Ser Ala His Asp	Val
395		400	405
Pro Lys Asp Val	Ile Met Gln Thr Trp	Asn Ser Gly Glu Gly	Glu
410		415	420
Gly Asn Ile Lys	Lys Leu Thr Ser Ala	Gly Tyr Asp Val Val	Val
425		430	435
Ser Thr Ser Asp	Phe Leu Tyr Leu Asp	Cys Gly Arg Gly Gly	Tyr
440		445	450
Val Thr Asn Asp	Ala Arg Tyr Asn Val	Gln Ser Asn Thr Asp	Gly
455		460	465
Gly Val Asn Phe	Asn Tyr Gly Gly Asp	Gly Gly Ser Trp Cys	Ala
470		475	480
Pro Tyr Lys Thr	Trp Gln Arg Ile Tyr	Asp Tyr Asp Phe Leu	Thr
485		490	495
Asn Leu Thr Ser	Ser Glu Ala Lys His	Ile Ile Gly Ala Glu	Ala
500		505	510
Pro Leu Trp Ser	Glu Gln Val Asp Asp	Val Thr Val Ser Ser	Val
515		520	525
Phe Trp Pro Arg	Ala Ala Ala Leu Gly	Glu Leu Val Trp Ser	Gly
530		535	540
Asn Arg Asp Ala	Ala Gly Arg Lys Arg	Thr Thr Ser Phe Thr	Gln
545		550	555
Arg Ile Leu Asn	Phe Arg Glu Tyr Leu	Val Ala Asn Gly Val	Met
560		565	570
Ala Thr Ala Leu	Val Pro Lys Tyr Cys	Leu Gln His Pro His	Ala
575		580	585
Cys Asp Leu Tyr	Lys Asn Gln Thr Val	Met Ser	
590		595	

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 7

## CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 375 aas

TIPO: aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: *Penicillium chrysogenum*

## CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: Secuencia de aas de la proteína  $\gamma$ -actina de 41760 Da de peso molecular.

- 56 -

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

Met	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	1	5	10	15
Met	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val	20	25	30	
Phe	Pro	Ser	Ile	Val	Gly	Arg	Pro	Arg	His	His	Gly	Ile	Met	Ile	35	40	45	
Gly	Met	Gly	Gln	Lys	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser	50	55	60	
Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val	65	70	75	
Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe	80	85	90	
Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Ile	Leu	Leu	95	100	105	
Thr	Glu	Ala	Pro	Ile	Asn	Pro	Lys	Phe	Asn	Arg	Glu	Lys	Met	Thr	110	115	120	
Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Tyr	Val	Ser	125	130	135	
Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Gly	140	145	150	
Ile	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	Pro	Ile	155	160	165	
Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Ser	Arg	Val	Asp	Met	170	175	180	
Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu	185	190	195	
Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arg	200	205	210	
Asp	Ile	Lys	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln	215	220	225	
Glu	Ile	Gln	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr	230	235	240	
Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Glu	Arg	Phe	245	250	255	
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Asn	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	260	265	270	
Ser	Gly	Gly	Ile	His	Val	Thr	Thr	Phe	Asn	Ser	Ile	Met	Lys	Cys	275	280	285	
Asp	Val	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ile	Val	Met	Ser	290	295	300	
Gly	Gly	Thr	Thr	Met	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Arg	Met	Gln	Lys	305	310	315	
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Met	Lys	Val	Lys	Ile	Ile	320	325	330	
Ala	Pro	Pro	Glu	Arg	Lys	Tyr	Ser	Val	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile	335	340	345	
Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Gln	Gln	Met	Trp	Ile	Ser	Lys	Gln	350	355	360	
Glu	Tyr	Asp	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ile	Val	His	Arg	Lys	Cys	Phe	365	370	375	

- 57 -

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 8

## CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 375 aas

TIPO: Aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: Acremonium chrysogenum

## CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: Secuencia de aas de la proteína  
γ-actina de 41612 Da de peso molecular.

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8

Met	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	1	5	10	15
Met	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val	20	25	30	35
Phe	Pro	Ser	Ile	Val	Gly	Arg	Pro	Arg	His	His	Gly	Ile	Met	Ile	40	45	50	55
Gly	Met	Gly	Gln	Lys	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser	60	65	70	75
Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val	80	85	90	95
Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe	100	105	110	115
Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Val	Leu	Leu	120	125	130	135
Thr	Glu	Ala	Pro	Ile	Asn	Pro	Lys	Ser	Asn	Arg	Glu	Lys	Met	Thr	140	145	150	155
Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Tyr	Val	Ser	160	165	170	175
Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Gly	180	185	190	195
Ile	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	Pro	Ile				
Tyr	Glu	Gly	Phe	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Ala	Arg	Val	Asp	Met				
Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu				


- 58 -

Arg Gly Tyr Thr	Phe Ser Thr Thr	Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg	
	200	205	210
Asp Ile Lys Glu	Lys Leu Cys Tyr Val	Ala Leu Asp Phe Glu Gln	
	215	220	225
Glu Ile Gln Thr	Ala Ala Gln Ser Ser	Ser Leu Glu Lys Ser Tyr	
	230	235	240
Glu Leu Pro Asp	Gly Gln Val Ile Thr	Ile Gly Asn Glu Arg Phe	
	245	250	255
Arg Ala Pro Glu	Ala Leu Phe Gln Pro	Ser Val Leu Gly Leu Glu	
	260	265	270
Ser Gly Gly Ile	His Val Thr Thr Phe	Asn Ser Ile Met Lys Cys	
	275	280	285
Asp Val Asp Val	Arg Lys Asp Leu Tyr	Gly Asn Ile Val Met Ser	
	290	295	300
Gly Gly Thr Thr	Met Tyr Pro Gly Leu	Ser Asp Arg Met Gln Lys	
	305	310	315
Glu Ile Thr Ala	Leu Ala Pro Ser Ser	Met Lys Val Lys Ile Ile	
	320	325	330
Ala Pro Pro Asp	Gly Lys Tyr Ser Val	Trp Ile Gly Gly Ser Ile	
	335	340	345
Leu Ala Ser Leu	Ser Thr Phe Gln Gln	Met Trp Ile Ser Lys Thr	
	350	355	360
Glu Tyr Asp Glu	Glu Arg Pro Ser Ile	Val His Arg Lys Cys Phe	
	365	370	375

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PCT-40	58/1	Solicitud internacional n°
--	--------	------	----------------------------

**INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)


<b>A.</b> Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>22</u> línea <u>16</u>	
<b>B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO</b> Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pALfle07 Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) Universidad de Valencia Edificio de Investigación 46100 BURJASOT (Valencia)	
Fecha de depósito 20.02.1997	n° de orden CECT 4849
<b>C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)</b> Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
<b>D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES</b> (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
<b>E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)</b> Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")	
<b>Reservado a la oficina receptora</b> <input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional Funcionario autorizado 	<b>Reservado a la Oficina internacional</b> <input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el: Funcionario autorizado

58/2

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PCT-40	Solicitud internacional n°
--	--------	----------------------------

**INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO**

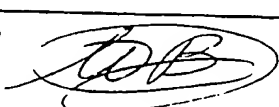
(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>28</u> , línea <u>20</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pALP480 Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) Universidad de Valencia Edificio de Investigación 46100 Burjasot (Valencia)	
Fecha de depósito 20.02.1997	n° de orden CECT 4852
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario) Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")	
Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	<input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado 	Funcionario autorizado

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PCT- 40	58/3 Solicitud internacional nº
--	---------	------------------------------------

**INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)


A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>33</u> línea <u>14</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/> <u>Escherichia coli DH5<del>α</del>/pALP315</u> Nombre de la institución de depósito <u>Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)</u> Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) <u>Universidad de Valencia</u> <u>Edificio de Investigación</u> <u>46100 Burjasot (Valencia)</u>	
Fecha de depósito <u>20-02-1997</u>	nº de orden <u>CECT 4851</u>
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario) Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")	
Reservado a la oficina receptora <input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional Funcionario autorizado 	Reservado a la Oficina internacional <input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el: Funcionario autorizado

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	58/4 PCT-40	Solicitud internacional n°
--	----------------	----------------------------

**INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>36</u> línea <u>26</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Escherichia coli DH5 $\alpha$ / pALC52 Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) Universidad de Valencia Edificio de Investigación 46100 Burjasot (Valencia)	
Fecha de depósito 20-02-1997	n° de orden CECT 4850
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario) Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")	

Reservado a la oficina receptora
<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional
Funcionario autorizado 

Reservado a la Oficina internacional
<input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado



REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del promotor del gen *gdh* de *Penicillium chrysogenum*.

2.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del promotor del gen *hex* de *Penicillium chrysogenum*.

3.- Un procedimiento para la expresión extracelular de proteínas en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos fusiones génicas con el gen *hex* de *Penicillium chrysogenum*.

4.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del gen *act* de *Penicillium chrysogenum*.

5.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del gen *act* de *Acremonium chrysogenum*.

6.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde el microorganismo transformado es un eucariota no humano, preferiblemente *Penicillium*, *Aspergillus* o *Acremonium*.

- 60 -

7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde el microorganismo utilizado es preferentemente *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* o *Acremonium chrysogenum*.

8.- Un compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* de 2811 pb acotado por los lugares de restricción Sau3AI y XbaI, el cual incluye el promotor del gen *gdh*.

9.- Un compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* de 7737 pb acotado por los lugares de restricción BamHI y SacI, el cual incluye el promotor del gen *hex*.

10.- Un compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* de 4947 pb acotado por los lugares de restricción BglII y EcoRI, el cual incluye el promotor del gen *act*.

11.- Un compuesto de ADN aislado de *A. chrysogenum* de 8650 pb acotado por dos lugares de restricción HindIII, el cual incluye el promotor del gen *act*.

12.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:1, la cual incluye el gen *gdh* de *P. chrysogenum*.

13.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:2, la cual incluye el gen *hex* de *P. chrysogenum*.

14.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:3, la cual incluye el gen *act* de *P. chrysogenum*.

15.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:4, la cual incluye el gen *act* de *A. chrysogenum*.

16.- Secuencias nucleotídicas hibridables bajo condiciones restrictivas con los compuestos de ADN de las reivindicaciones 8 a 15.

17.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:5, que se corresponde con la enzima glutamato deshidrogenasa de *P. chrysogenum*.

- 61 -

18.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:6, que se corresponde con la enzima  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa de *P. chrysogenum*.

5 19.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 7, que se corresponde con la proteína  $\gamma$ -actina de *P. chrysogenum*.

20.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 8, que se corresponde con la proteína  $\gamma$ -actina de  
10 *A. chrysogenum*.

21.- Vectores que portan los compuestos de ADN descritos en las reivindicaciones 8 a 16, ó fragmentos de los mismos.

22.- Vectores de acuerdo con la reivindicación 21,  
15 caracterizados por consistir en un plásmido.

23.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizados por consistir en pALP784, pALP785 y pALfleo7.

24.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22,  
20 caracterizados por consistir en pALP295, pALP319, pALP377, pALP388 y pALP480.

25.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizados por consistir en pALP315 y pALP316.

26.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22,  
25 caracterizados por consistir en pALC52 y pALC53.

27.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados, no humanos, con una expresión incrementada de genes homólogos o heterólogos, caracterizado por comprender las siguientes operaciones:

- 62 -

- a) Construir vectores que porten, total o parcialmente, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o compuestos de ADN recombinante de las mismas.
- b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados que expresen los genes homólogos o heterólogos.
- c) Seleccionar los organismos transformados que presentan incrementada la expresión de los genes de homólogos o heterólogos cuando se comparan con organismos controles sin transformar.

28.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados no humanos capaces de producir proteínas extra-celulares caracterizado por comprender las siguientes operaciones:

- a) Construir vectores que porten, total o parcialmente SEQ ID NO: 2 ó compuestos de ADN recombinante de la misma.
- b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados que expresen y secreten al menos una proteína.
- c) Seleccionar los organismos transformados capaces de secretar al menos una proteína en niveles superiores respecto de organismos controles sin transformar.

29.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados, no humanos, con una expresión génica anti-sentido, bloqueando total o parcialmente su actividad, caracterizado por comprender las siguientes operaciones:

- a) Construir vectores que porten, total o parcialmente, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o compuestos de ADN recombinante de las mismas.

- 63 -

b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados con expresión génica antisentido.

5 c) Seleccionar los organismos transformados que presentan bloqueada total o parcialmente la expresión del gen cuando se comparan con organismos controles sin transformar.

10 30.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según la reivindicaciones 27 y 29, caracterizado porque los vectores utilizados son los definidos en las reivindicaciones 21 a 26, o se obtienen a partir de los mismos.

15 31.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según la reivindicación 28, caracterizado porque los vectores utilizados son los definidos en la reivindicación 24, o se obtienen a partir de los mismos.

32.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según las reivindicaciones 27 a 31, en que el organismo hospedador utilizado es un eucariota no humano, preferiblemente *Penicillium*, *Aspergillus* o *Acremonium*.

20 33.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, donde el microorganismo utilizado es preferentemente *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* o *Acremonium chrysogenum*.

25 34.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según las reivindicaciones 27 a 31, en que el organismo hospedador utilizado es un procariota, preferentemente *Escherichia coli* o un actinomiceto.

30 35.- Organismos transformados, no humanos, caracterizados porque se les han introducido las secuencias de ADN de las reivindicaciones 8 a 16, incluidas total o parcialmente en los vectores de las reivindicaciones 21 a 26,

- 64 -

obtenibles por el procedimiento descrito en las reivindicaciones 27 a 34.

36.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 35, caracterizado por consistir en un procariota, preferentemente *Escherichia coli* o un actinomiceto.

37.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 35, caracterizado por consistir en un eucariota, preferentemente del género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* o *Saccharomyces*.

38.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 36, caracterizado por consistir preferentemente en *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Acremonium chrysogenum* o *Saccharomyces cerevisiae*.

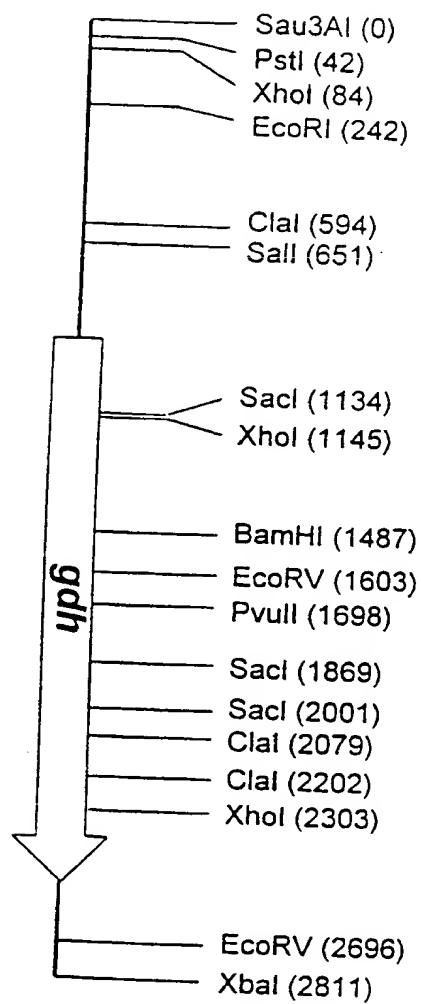
39.- Organismo según la reivindicación 36, caracterizado por consistir en cepas puras representadas por CECT4849, CECT4852, CECT4851 y CECT4850 o sus mutantes y derivados transformados.

40.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de antibióticos.

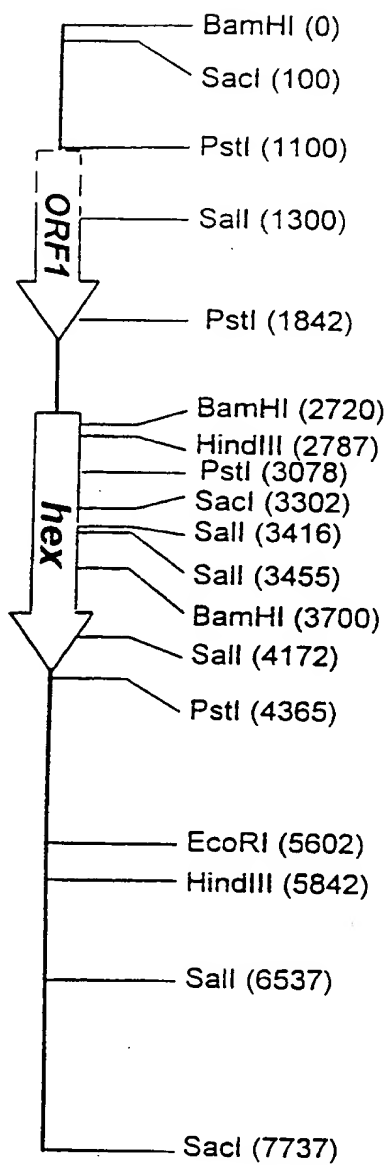
41.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de penicilina.

42.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de cefalosporinas.

1 / 6

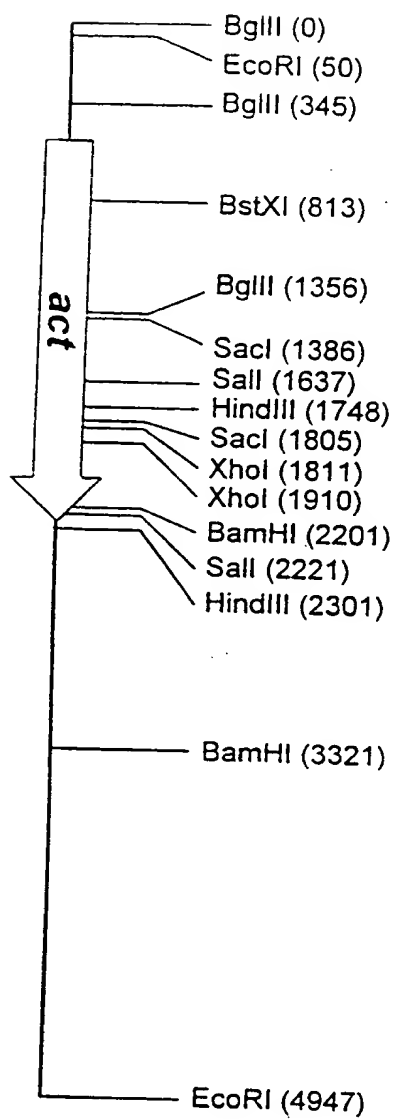
**Figura 1**

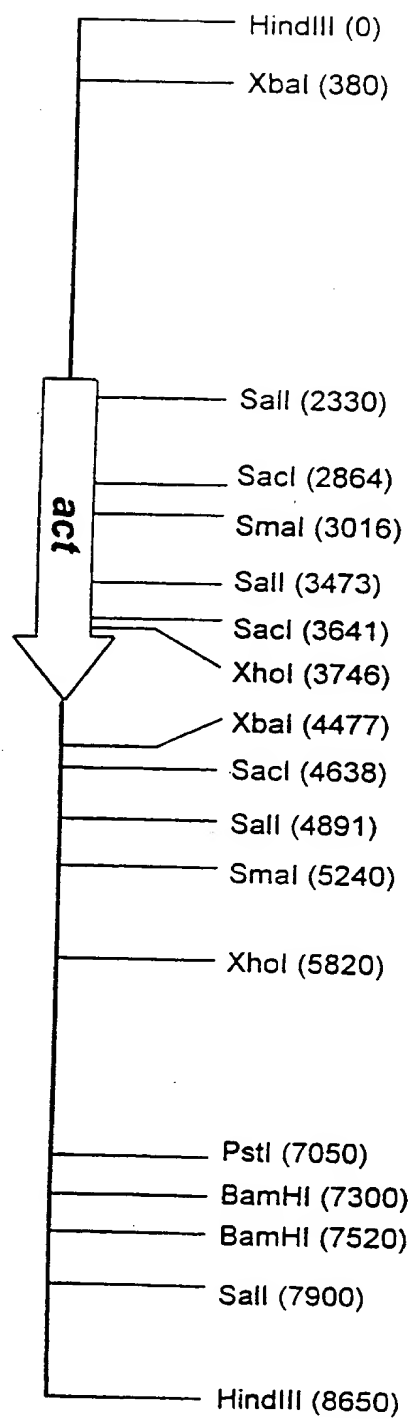
2/6

**Figura 2**



3/6

**Figura 3**

**Figura 4**

5/6

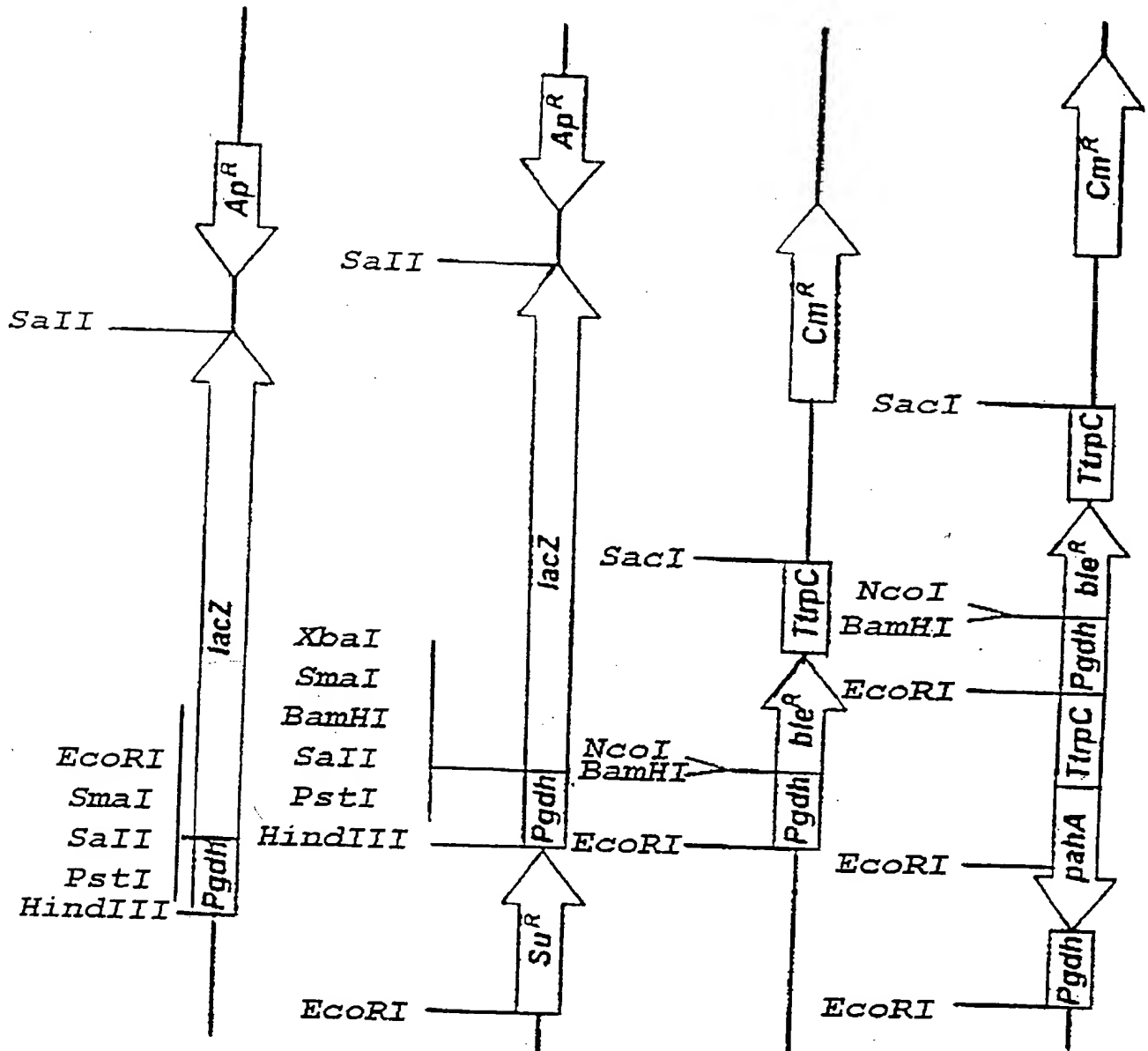


Figura 5

6/6

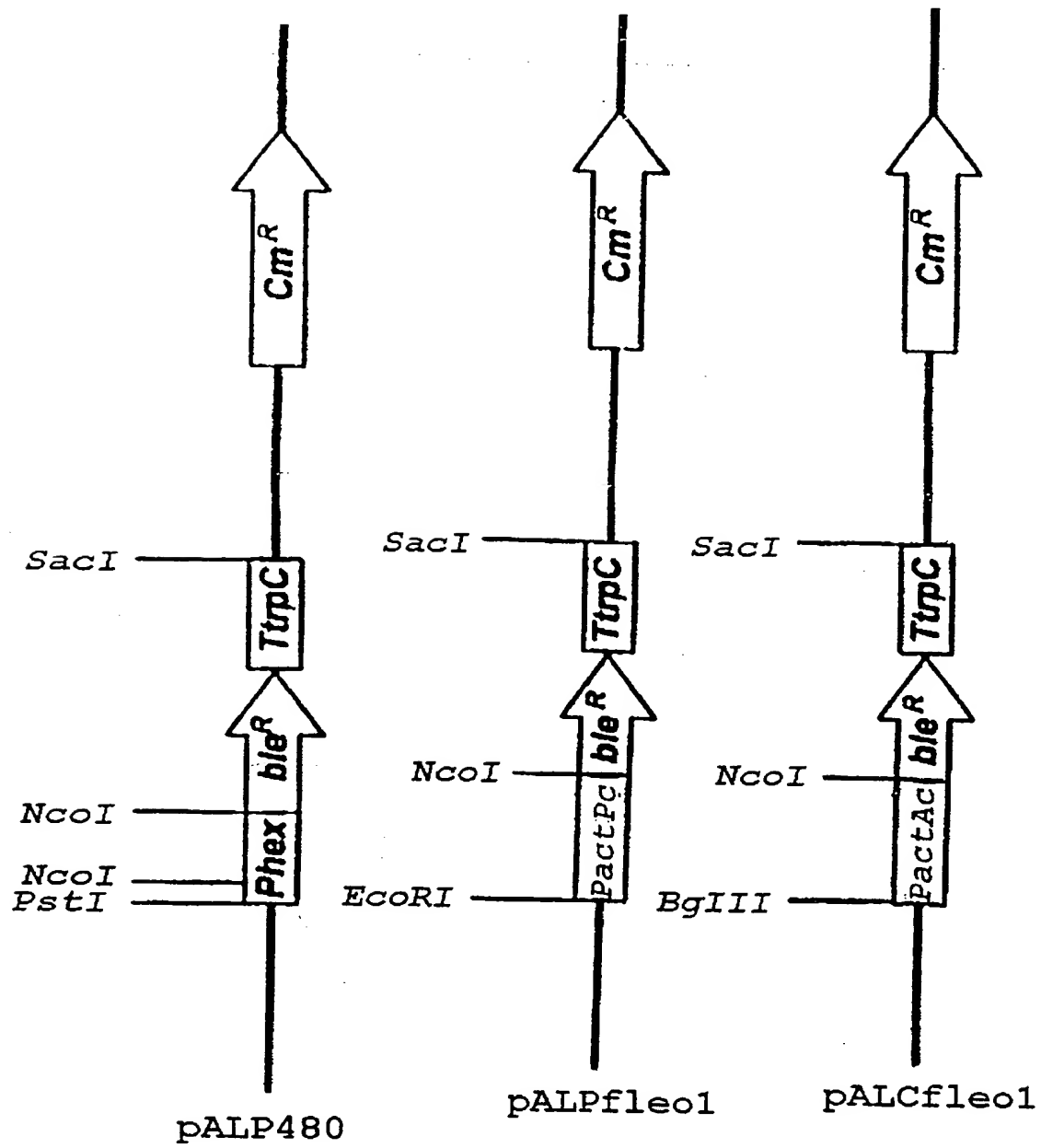


Figura 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00056

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup>: C 12 N 15/80, 15/53 15/56, 9/06, 9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>6</sup>: C 12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, EPODOC, EMBASE, BIOSIS, CA, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOGATI, M. et al. "NADP - specific glutamate dehydrogenase of <i>Penicillium chrysogenum</i> has a homohexamer structure", JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 1996, vol. 36. number 5, pages 371-375 see the whole document	17
X	SHEN, H-D et al. "Molecular cloning of CDNA coding for the 68 kda allergen of <i>Penicillium notatum</i> using Mo Abs", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1995, vol. 25, pages 350-356	9,13,16,18
Y	see the whole document	2,6,7,21,22,24 27,29-38,40,41
X	FIDEL, S. et al., " <i>Aspergillus nidulans</i> contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin", GENE, 1998, vol, pages 283-293	10,11,14,15,16,19,20
Y	see the whole document	4-7,21,22,25-27 29-38,40,41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 June 1998 (02.06.98)Date of mailing of the international search report  
18 June 1998 (18.06.98)Name and mailing address of the ISA/  
S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00056

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0225078 A (PANLABS, INC.) 10 June 1987 (10.06.87) pages 3,4 page 6, line 23- page 7, line 23 claims, 1,2,4-6,8,9	1,6-8,16,21-23,27, 29-38,40,41
Y	EP 0215539 A (GLAXO GROUP LTD) 25.03.87 see the whole document	1,2,4-8,21-27,29- 38,40,41
A	JAKLITSCH, W.M. et al. "Glutamate pools and Glutamate dehydrogenase regulation in relation to Penicillin biosynthesis in strains of <i>Penicillium chrysogenum</i> ", EXPERIMENTAL MYCOLOGY, 1985, vol. 9, pages 310-317	
A	FREDERICK, G.D. et. al. "Distant upstream regulatory sequences control the level of expression of the am (GDH) locus of <i>Neurospora crassa</i> ", CURRENT GENETICS, 1990, vol. 18, pages 53-58.	
A	HAWKINS, A. R, et al. "Nucleotide sequence and regulation of expression of the <i>Aspergillus nidulans</i> gdh A gene encoding NADP dependent glutamate dehydrogenase", MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, 1989, vol. 218, pages 105-111	
A	POCSI, I. et al. "The formation of N-acetyl-beta-D- hexosaminidase is repressed by glucose in <i>Penicillium chrysogenum</i> ", J. BASIC MICROBIOL., 1993, vol. 33, number 4, pages 259-267	
P,X	GUTIERREZ, S. et al. "Expression of the cef G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in <i>Acremonium chrysogenum</i> ", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1997, vol. 48, pages 606-614 see the whole document	1-41